

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Zelluläre und humorale Immunantwort  
herztransplantierter, immunsupprimierter  
Kinder nach Auffrischimpfungen mit  
Diphtherie-und Tetanustoxoid**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

**vorgelegt von**  
**Birgit Dorothea Rieck**

**aus**  
**München**

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Bernd H. Belohradsky
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Karl-Heinz Herbinger Priv. Doz. Dr. Wolfgang Fischer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Simon Urschel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	02.05.2013

gewidmet

Dr. med. Elisabeth Tummes

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1.	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
1.2.	HISTORISCHE ENTWICKLUNG DER HERZTRANSPLANTATION.....	2
1.3.	AKTUELLER WISSENSSTAND ZUR HERZTRANSPLANTATION.....	2
1.4.	DAS IMMUNSYSTEM – T-UND B-LYMPHOZYTEN .....	3
1.4.1.	<i>T-Lymphozyten</i> .....	3
1.4.2.	<i>B-Lymphozyten</i> .....	4
1.5.	IMMUNISIERUNG UND DEREN BEDEUTUNG FÜR TRANSPLANTIERTE KINDER.....	5
1.5.1.	<i>Passive Immunisierung</i> .....	5
1.5.2.	<i>Aktive Immunisierung</i> .....	6
1.6.	PATHOPHYSIOLOGIE DER TRANSPLANTATABSTOßUNG.....	7
1.7.	ARTEN UND WIRKMECHANISMEN DER IMMUNSUPPRESSIVA .....	7
1.7.1.	<i>Tacrolimus (FK 560)</i> .....	8
1.7.2.	<i>Mycophenolat Mofetil (MMF)</i> .....	9
<b>2.</b>	<b>PATIENTEN UND METHODEN .....</b>	<b>10</b>
2.1.	STUDIENDESIGN .....	10
2.1.1.	<i>Probanden</i> .....	10
2.1.2.	<i>Probengewinnung und Ablauf des klinischen Teils</i> .....	12
2.1.3.	<i>Impfstoffe</i> .....	14
2.1.4.	<i>Erhebung der klinischen Patientendaten</i> .....	16
2.1.4.1.	<i>Patiententagebuch</i> .....	16
2.2.	EXPERIMENTELLER TEIL.....	17
2.2.1.	<i>Material</i> .....	17
2.2.1.1.	<i>Geräte</i> .....	17
2.2.1.2.	<i>Verbrauchsmaterialien:</i> .....	17
2.2.1.3.	<i>Lösungen, Chemikalien, Antikörper und Toxoide</i> .....	17
2.2.2.	<i>Ablauf des experimentellen Teils</i> .....	19
2.2.3.	<i>Immunologische Methoden</i> .....	19
2.2.3.1.	<i>Lymphozytenseparation</i> .....	19
2.2.3.1.1.	<i>Durchführung der Lymphozytenseparation</i> .....	19
2.2.3.2.	<i>Lymphozytenkultivierung und -stimulation</i> .....	20
2.2.3.2.1.	<i>Durchführung der Lymphozytenkultivierung/-stimulierung</i> .....	21

2.2.3.3. Durchflusszytometrie/FACS-Analyse.....	22
2.2.3.3.1. Färbung der Lymphozyten mit an Fluorochrom gebundenen Antikörpern.....	22
2.2.3.3.2. Prinzip der Durchflusszytometrie.....	22
2.2.3.3.3. Auswertung der FACS-Analysen.....	24
2.2.3.4. Titerbestimmung im ELISA-Verfahren.....	27
2.2.3.4.1. Durchführung der Titerbestimmung im ELISA-Verfahren.....	28
2.3. STATISTIK.....	29
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
3.1. AUSWERTUNG DER PATIENTENDATEN.....	30
3.1.1. Körpergewicht.....	30
3.1.2. Indikation zur Transplantation.....	30
3.1.3. Medikamentöse Therapie.....	33
3.1.4. Medikation mit Immunsuppressiva und deren Abhängigkeit von Variablen.....	34
3.1.4.1. Mycophenolat Mofetil und Tacrolimus.....	34
3.1.4.2. Steroide.....	37
3.1.5. Sonstige Medikamente.....	37
3.1.6. Impfstatus.....	39
3.1.6.1. Unerwartete Titeranstiege vor Impfung.....	42
3.2. AUSWERTUNG DES EXPERIMENTELLEN TEILS.....	43
3.2.1. Humorale Immunantwort auf Impfung.....	43
3.2.1.1. Humorale Immunantwort und Einflussfaktoren.....	45
3.2.1.2. Differenz des Titeranstieges von vor zu nach Impfung.....	47
3.2.1.3. Auswertung der humoralen Immunantwort über Faktoren.....	51
3.2.1.4. Impfversager.....	54
3.2.2. Immunantwort der T-Zellen auf Impfung.....	54
3.2.2.1. Auswertung des Anteils der exprimierenden Zellen.....	54
3.2.2.2. Auswertung der Intensität der Expression über alle T-Lymphozyten.....	59
3.2.2.3. Differenzen des Anstieges der medianen Fluoreszenzintensität vor zu nach Impfung.....	60
3.2.2.4. Differenzen der Werte der PHA-Stimulierung der CD25-Expression abzüglich der Werte der Negativkontrolle.....	64
3.2.3. Verträglichkeit der Impfung.....	66
3.2.4. Weitere einflussnehmende Faktoren.....	68
3.2.4.1. Ort der Impfung.....	68
3.2.4.2. Abstand zwischen Blutentnahme und FACS-Analyse.....	68
3.2.4.3. Differenz zwischen Impfung und 2. Blutentnahme.....	68

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
4.1.	PATIENTEN UND METHODEN .....	69
4.1.1.	<i>Patientenzahl</i> .....	69
4.1.2.	<i>Medikation</i> .....	69
4.1.2.1.	Immunsuppressiva .....	69
4.1.2.2.	Sonstige Medikamente .....	70
4.1.3.	<i>Impfstatus</i> .....	71
4.1.3.1.	Unerwartete Titeranstiege vor Impfung .....	72
4.2.	ERGEBNISTEIL .....	74
4.2.1.	<i>Humorale Immunantwort auf Impfung</i> .....	74
4.2.1.1.	Erreichen protektiver Titer .....	74
4.2.1.2.	Titeranstiege in Differenzen .....	75
4.2.1.3.	Titeranstiege in Faktoren .....	76
4.2.1.4.	Zusammenhänge der Titeranstiege und Titer vor und nach Impfung .....	77
4.2.1.5.	Unterschiede unserer Kohorte zu Kohorten anderer Studien .....	77
4.2.1.6.	Einfluss des Tacrolimus auf die humorale Immunantwort .....	77
4.2.1.7.	Gründe für die Beeinflussung der humoralen Antwort durch Tacrolimus .....	78
4.2.1.8.	Impfversager .....	78
4.2.1.9.	Vorschläge zur Verbesserung der humoralen Immunantwort .....	79
4.2.1.10.	Ausblick .....	79
4.2.2.	<i>Zelluläre Immunantwort auf Impfung</i> .....	79
4.2.2.1.	Hintergrund und Problematik der Untersuchung der Effekte von Auffrischimpfungen .....	80
4.2.2.2.	Vergleich unserer Ergebnisse zur zellulären Immunantwort mit anderen Studien .....	81
4.2.2.3.	Einschränkung der zellulären Immunantwort und der Stimulation .....	85
4.2.2.3.1.	Einschränkung der Expression von CD25 und der Stimulation mit PHA .....	85
4.2.2.3.2.	Einschränkung der Expression von HLA-DR .....	87
4.2.2.3.3.	Unspezifische Erhöhung der HLA-DR-Expression auf CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten nach Impfung .....	88
4.2.2.3.4.	Einschränkung der Stimulation mit Antigenen und Mitogenen .....	89
4.2.2.4.	Beeinflussende Faktoren der zellulären Immunantwort .....	90
4.2.2.4.1.	Korrelation der zellulären Immunantwort mit klinischen Parametern .....	90
4.2.2.4.2.	Einfluss von Tacrolimus .....	91
4.2.2.4.3.	Einfluss der Impfungen vor Transplantation auf die Immunantwort .....	91
4.2.2.5.	Ausschluss von systematischen Fehlern und Methodenkritik .....	92
4.2.2.5.1.	Ausschluss von Fehlern im Versuchsaufbau .....	92
4.2.2.5.2.	Problematik der FACS-Analyse als Methode zur Bestimmung der zellulären Immunantwort .....	93
4.2.2.5.3.	Alternativen zur FACS-Analyse .....	94
4.2.2.5.4.	Methodenkritik .....	94
4.2.3.	<i>Einflüsse der Impfung auf die Abstoßung der transplantierten Organe</i> .....	96
4.2.4.	<i>Nebenwirkungen der Impfungen</i> .....	97

<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>109</b>
<b>8.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>115</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BE	Blutentnahme
CD	Cluster of differentiation
DiffTit	Differenz der Titer vor/nach Impfung
DiffFl4/25	Differenz der Mediane der Fluoreszenz bezüglich der CD25-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten
DiffFl4/HLA	Differenz der Mediane der Fluoreszenz bezüglich der HLA-DR-Expression auf CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten
Diph	Diphtherietoxoid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FaktTit	Faktoren der Titer vor/nach Impfung
FSC	Forward scatter
HepB	Hepatitis B
Hib	<i>Haemophilus influenzae Typ B</i>
HLA	Human leucocyte antigen
HLT <sub>x</sub>	Herz-Lungen-Transplantation
HT <sub>x</sub>	Herztransplantation
HyperIgG	Spezifische Immunglobuline
I.E.	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IPV	Inaktivierte Poliomyelitis Vakzine
ivIG	Standardimmunglobuline
KK	Korrelationskoeffizient
KG	Körpergewicht



## Abkürzungsverzeichnis

---

Lj.	Lebensjahr
Min	Minimum
Max	Maximum
MMF	Mycophenolat Mofetil
MPA	Mycophenolsäure
n	Anzahl
NF-AT	Nuclear factor of activated t-cells
n.s.	nicht signifikant
Pat	Patient/Patienten
PHA	Phytohämagglutinin
s.	signifikant
sIg	Oberflächen-Antikörper
SSC	Side scatter
stim.	stimuliert
Sympt.	Symptome
Tet	Tetanustoxoid
Tx	Transplantation
unkult	unkultiviert
unstim	unstimuliert

# 1. Einleitung

## 1.1. Fragestellung und Zielsetzung

Im Bereich der Transplantation von Geweben, Zellen und Organen sind in den letzten 30 Jahren signifikante medizinische Erfolge erzielt worden. Dies liegt neben der Verbesserung der operativen Techniken vor allem an den Fortschritten im Bereich der perioperativen Therapie. Insbesondere die Prophylaxe der akuten Transplantatabstoßung durch die Entwicklung verschiedener Immunsuppressiva hat die Etablierung der Transplantation zu einer erfolgsversprechenden Therapieoption ermöglicht. Jedoch bringt die immunsuppressive Medikation auch Nachteile z.B. in Form eines erhöhten Infektions- und eines erhöhten Tumorrisikos mit sich. Da die immunsuppressive Therapie unter anderem die Wirksamkeit des Immunsystems auf körperfremde Substanzen unterdrückt, ist die Vermutung naheliegend, dass die Reaktion des Immunsystems auf aktive Impfungen eingeschränkt ist.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Auffrischimpfungen gegen Diphtherie und Tetanus bei immunsupprimierten Kindern nach Herztransplantation zu einer ausreichenden Immunität führen. Die Reaktion des Immunsystems wird dabei sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene beurteilt. Die Titer der Patienten gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid werden vor Impfung und nach Impfung verglichen und ermittelte Ergebnisse mit Resultaten aus Studien mit gesunden und transplantierten Lymphozyten betrachtet, deren Grad der Aktivierung in Form einer Expression von Oberflächenantigenen ausgewertet wird. Ein besonderer Schwerpunkt liegt auf der Interaktion von verabreichten Immunsuppressiva mit dem Immunsystem. Deren Einfluss auf die humorale und zelluläre Immunantwort wird in dieser Arbeit ausgewertet und diskutiert.

Des Weiteren wird die Frage untersucht, ob durch die Aktivierung des Immunsystems infolge der Impfung eine erhöhte Gefahr der Transplantatabstoßung besteht. Mittels Auswertung der unspezifischen T-Zellantwort und eines Fragebogens über Symptome einer Transplantatabstoßung in den ersten 14 Tagen nach Impfung wird auch diese Fragestellung behandelt. Auch das Spektrum der Impfnebenwirkungen wird anhand des 14 Tage geführten Tagebuches ausgewertet und die ermittelten Daten mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Problematik der eingeschränkten Immunantwort unter Immunsuppression zu erörtern und einen Beitrag zur Impfempfehlung von Totimpfstoffen für immunsupprimierte Patienten zu leisten.

## 1.2. Historische Entwicklung der Herztransplantation

Seit der ersten erfolgreichen allogenen Herztransplantation am Erwachsenen durch Prof. Christian Barnard am 3. Dezember 1967 und der ersten Herztransplantation am Kind durch Dr. Adrian Kantrowitz 3 Tage später hat sich die Herztransplantation innerhalb weniger Jahrzehnte stark gewandelt.<sup>1</sup> Von einer experimentellen und hochriskanten Operation mit geringen Überlebenschancen hat sie sich zu einer etablierten und erfolgreichen Therapiemöglichkeit vieler schwerwiegender angeborener und erworbener Herzerkrankungen entwickelt.<sup>2</sup>

Diese Entwicklung ist neben der Verbesserung der operativen Techniken vor allem auf die Fortschritte in der perioperativen Pflege und Therapie zurückzuführen.<sup>1</sup> In diesem Bereich spielt das Management der Immunsuppression zur Verhinderung der akuten Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle. Schon vor den ersten Herztransplantationen am Menschen, im Jahr 1960, beobachteten Lower und Shumway diese Zusammenhänge.<sup>3</sup>

Im Jahre 1967 waren Cortison und Azathioprin (Antimetabolit) als Immunsuppressiva bekannt und wurden als solche nach Organtransplantationen eingesetzt. Jedoch war die Überlebensrate nach Transplantation gering. Erst die Entdeckung eines Extraktes aus Pilzen mit starker immunsuppressiver Wirkung in den 1970er Jahren und die daraus folgende Synthese von Cyclosporin A (Calcineurin-Inhibitor) in den 1980er Jahren verbesserten das Überleben deutlich. Dies schuf die Voraussetzungen für langfristig erfolgreiche Transplantationen.<sup>3</sup>

Mit der ersten erfolgreichen neonatalen Herztransplantation durch Leonard Bailey und Kollegen im Jahr 1985 begann die Etablierung der Herztransplantation bei Kindern als Therapieoption.<sup>4</sup> Ab diesem Zeitpunkt stiegen die Operationszahlen bis 1991 weltweit stetig an, um seitdem bei ungefähr 400 Operationen pro Jahr zu stagnieren.<sup>5</sup>

## 1.3. Aktueller Wissensstand zur Herztransplantation

Durch die Etablierung weiterer Immunsuppressiva, wie Mycophenolat Mofetil (Antimetabolit), Tacrolimus (Calcineurin-Inhibitor) sowie den mammalian Target of Rapamycin (mTOR) -Inhibitoren Sirolimus und Everolimus ist es nun möglich die akute Transplantatabstoßung in vielen Fällen zu verhindern.

Der führende lebenslimitierende Faktor ist gegenwärtig die chronische Transplantatabstoßung,<sup>5</sup> die sich als Vaskulopathie der Koronararterien und letztendlich als Herzversagen manifestiert.<sup>6</sup> Im Gegensatz zu der akuten Abstoßung konnte das Auftreten dieser Abstoßungsreaktion in den letzten Jahrzehnten nicht verringert werden.<sup>1</sup> Auch mit den jetzigen Medikamenten kann dieser Vorgang zwar hinausgezögert aber nicht vollständig verhindert werden. Die chronische Transplantatabstoßung mündet meist in der Notwendigkeit einer Retransplantation oder im Versterben des Patienten.

Infektionen erhöhen die Mortalität nach Transplantation,<sup>6</sup> vor allem im ersten postoperativen Jahr.<sup>5</sup> Des Weiteren können sie das Voranschreiten der chronischen Abstoßungsreaktion beschleunigen.<sup>7,8</sup> Ihr Auftreten ist durch die Immunsuppression vermehrt und der Verlauf ist schwerwiegender als bei gesunden Menschen.<sup>8,9,10</sup> Auf Grund dieser Problematik muss bei immunsupprimierten Patienten besonders auf die Infektionsprophylaxe geachtet werden. Zur Infektionsprophylaxe eignen sich medikamentöse Prophylaxen sowie passive und aktive Impfungen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Effektivität und die Sicherheit aktiver Impfungen mit Diphtherie- und Tetanustoxoid untersucht.

#### 1.4. Das Immunsystem – T- und B-Lymphozyten

Das Immunsystem des Menschen dient der Erkennung und Eliminierung von körperfremden und potentiell schädlichen Zellen. Es lässt sich zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Abwehr differenzieren. Die unspezifische Abwehr besteht unter anderem aus Plasmaproteinen, wie dem Komplementsystem, und aus Zellen, wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen. Sie bekämpft schnell und unspezifisch körperfremde Zellen. In Ergänzung dazu existiert die spezifische Abwehr. Diese besteht aus Zellen, deren größten Teil die T- und B-Lymphozyten ausmachen. Die spezifische Abwehr kann durch Erkennung spezifischer Antigene auch veränderte körpereigene Zellen, Toxine und Erreger bekämpfen. Sie braucht aber auf Grund vielfältiger Zellinteraktionen, Proliferations- und Differenzierungsvorgänge Tage bis zur vollständigen Aktivierung.<sup>11</sup> Bei der Aktivierung werden jedoch auch Gedächtniszellen gebildet, die bei einer erneuten Infektion eine deutlich schnellere Immunantwort ermöglichen.<sup>12</sup> Die spezifische Immunantwort mittels T- und B-Lymphozyten, insbesondere die Gedächtniszellbildung, spielt bei der Impfung eine große Rolle, weshalb sie im Folgenden kurz erläutert wird.

##### 1.4.1. *T-Lymphozyten*

Die Vorstufen der T-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und reifen im Thymus zu den naiven T-Lymphozyten heran. Die naiven T-Lymphozyten werden primär in zwei Untergruppen geteilt: CD4- und CD8-positive Lymphozyten (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten). Diese wandern über die Blutgefäße in Organe des peripheren Lymphsystems, u.a. Lymphknoten, Milz und Peyersche Plaques. Um dort aktiviert zu werden, sind naive T-Lymphozyten darauf angewiesen, dass ihnen Antigene präsentiert werden. Die Präsentation der Antigene erfolgt über Histokompatibilitäts-Moleküle (major histocompatibility complex, MHC) die interindividuell stark variabel sind. MHC-I-Moleküle werden von jeder kernhaltigen Zelle exprimiert und MHC-II-Moleküle vorwiegend von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC). Naive CD4<sup>+</sup> Lymphozyten erkennen Antigene über MHC-II-Moleküle und naive CD8<sup>+</sup> Lymphozyten über MHC-I-Moleküle.<sup>11,13</sup>

Für eine Aktivierung und Differenzierung der naiven T-Lymphozyten zu Effektorzellen bedarf es dreier Signale. Das erste Signal ist das Erkennen eines, auf einem MHC-Molekül präsentierten, spezifischen Antigens. Das zweite Signal ist eine Co-Stimulation durch ein weiteres Oberflächenantigen. Das erste und zweite Signal ermöglichen die Aktivierung und die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und hochaffiner IL-2-Rezeptoren (CD25). Diese führen zu einer Proliferation der T-Lymphozyten. Die Differenzierung in eine der verschiedenen Effektorzellen erfolgt über das dritte Signal, über Zytokine. Je nach Vorherrschen eines bestimmten Zytokins entwickelt sich eine bestimmte Effektorzelle.<sup>11</sup>

Die Effektor-T-Zellen exprimieren einige Oberflächenantigene, unter anderem HLA-DR und CD25.<sup>14,15</sup> HLA-DR ist ein MHC-II-Molekül, das bei Stimulierung auch auf T-Lymphozyten exprimiert wird,<sup>13</sup> und CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors.<sup>11,13,14,16</sup>

Während die naiven T-Zellen eine Co-Stimulation zur Aktivierung benötigen, bedürfen die Effektorzellen zur Ausübung ihrer Aufgaben nun keiner Co-Stimulation, sondern lediglich eines spezifischen Antigenkontaktes.

Es werden verschiedene Effektorzellen unterschieden. Die naiven  $CD4^+$  Lymphozyten entwickeln sich zu T-Helfer-Zellen des Typs 1, 2 und 17 ( $TH_1$ ,  $TH_2$  und  $TH_{17}$ ) und zu regulatorischen Lymphozyten. Werden die  $CD4^+$  Lymphozyten zu Effektorzellen aktiviert setzen sie Zytokine frei. Zytokine induzieren entweder zelluläre Abwehr (durch Zytokine von  $TH_1$  und  $TH_{17}$ ), vermittelt über aktivierte zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und Monozyten oder humorale Abwehr (durch Zytokine von  $TH_1$  und  $TH_2$ ), vermittelt durch Antikörperbildung der zu Plasmazellen differenzierten B-Zellen. Auch wirken sie regulatorisch auf die T-Zell-Antwort.<sup>11</sup>

Die naiven  $CD8^+$  Lymphozyten entwickeln sich zu zytotoxischen T-Zellen. Sie erkennen über MHC-I-Moleküle präsentierte fremde Antigene. Die fremden Antigene weisen auf eine Veränderung oder Infektion der betreffenden Zellen hin. Das Erkennen der fremden Antigene veranlasst die zytotoxischen T-Lymphozyten eine Apoptose in diesen Zellen einzuleiten.<sup>11</sup>

Die Effektorzellen leben unterschiedlich lang. Der größte Anteil der Effektorzellen stirbt mit dem Auslöschen der spezifischen Antigene. Lediglich ein kleiner Anteil der Effektorzellen bleibt weiter bestehen und bildet die Gedächtniszellen. Diese können bei einem erneuten Antigenkontakt wieder zu Effektorzellen aktiviert werden.

#### 1.4.2. *B-Lymphozyten*

Die B-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und reifen dort zu naiven B-Zellen. Diese gelangen in die Blutbahn und siedeln sich in Lymphfollikeln an. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche B-Zell-Rezeptoren in Form von Immunglobulinen (Ig), sogenannten surface immunoglobulins (sIg),<sup>11</sup> die spezifisch für ein bestimmtes Antigen sind. Über diese erfolgt die Aktivierung der naiven B-Zellen. Es gibt zwei Möglichkeiten der B-Zell-Antwort, zum einen die T-Zell-abhängige B-Zellantwort und zum anderen die T-Zell-unabhängige B-Zellantwort.<sup>11,17</sup> Die T-

Zellabhängige B-Zellantwort spielt bei der Erkennung von Proteinen eine wichtige Rolle. Bei Antigenkontakt wird das Antigen gebunden, aufgenommen, prozessiert und auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Zur Aktivierung der B-Zelle und zur Einstufung des Peptides als fremd und potentiell gefährlich bedarf es einer aktivierten TH<sub>2</sub>-Helferzelle oder APC, die bereits durch dieses Antigen aktiviert worden ist. Findet dieser Kontakt statt, induziert dies durch Expression von CD40-L, Produktion von IL-4 und weiterer Zytokine durch TH<sub>2</sub>-Helferzellen eine Proliferation dieser spezifischen B-Zelle.<sup>18,19</sup> Weiterhin kommt es zu einer Differenzierung der B-Zellen zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen, zu einem Wechsel der Antikörperproduktion von IgM zu anderen Ig-Klassen und einer Gedächtniszellbildung.<sup>19</sup> Die T-Zell-unabhängige B-Zellantwort besteht aus einer direkten Aktivierung via Signalkaskade durch Bindung des Antigens an den B-Zellrezeptor.<sup>19,20</sup> Diese Art der Aktivierung erfolgt überwiegend bei der Interaktion mit Polysacchariden.<sup>9,17,19</sup>

In dieser Arbeit spielt vor allem die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung eine Rolle, da die verwendeten Impfstoffe vorwiegend aus Peptiden bestehen.

Die von den Plasmazellen sezernierten Antikörper haben mehrere Effekte. Sie neutralisieren die Erreger und verhindern damit ein Anheften der Erreger an Zellen. Sie kennzeichnen (opsonieren) die Erreger, die dann von Phagozyten aufgenommen und zerstört werden können. Weiterhin aktivieren sie das Komplementsystem, was wiederum Opsonierung veranlasst und den Erreger direkt zerstören kann.

### **1.5. Immunisierung und deren Bedeutung für transplantierte Kinder**

Infektionen verlaufen in immunsupprimierten Patienten schwerer, komplikationsreicher und treten gehäuft auf.<sup>21,22</sup> Um diesen vorzubeugen können unter anderem aktive und passive Immunisierungen durchgeführt werden. Besonders bei transplantierten Kindern ist es sehr wichtig auf die Immunisierung der Kinder zu achten, da durch die schweren Erkrankungen der Kinder vor Transplantation die Impfungen meist unvollständig sind.<sup>23</sup> Desweiteren haben sie durch ihr junges Alter zum Zeitpunkt der Transplantation nur in seltenen Fällen bereits impfpräventable Erkrankungen durchgemacht. Auch können impfpräventable Infektionen zu Transplantatabstoßungen führen,<sup>24,25</sup> was die Bedeutsamkeit der Immunisierung als prophylaktische Maßnahme zusätzlich unterstreicht.

#### **1.5.1. Passive Immunisierung**

Mit passiver Immunisierung wird eine Gabe von Immunglobulinen bezeichnet. Diese Immunglobulingaben können als spezifische Immunglobuline z.B. gegen Cytomegalie-Virus oder Varizella-Virus (Hyperimmunglobuline), aber auch als unspezifische Immunglobuline (Standardimmunglobuline) verabreicht werden. Die Immunglobuline haben Auswirkungen auf die Antikörperkonzentrationen im Blut und können auch spezifisch Titer gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid erhöhen. Immunglobuline können abhängig von ihrer Dosierung einen unterschiedlich

langen Schutz gewährleisten. So berichten Verma et al. von einem Schutz durch protektive Immunglobulintiter von bis zu 3 Wochen bei Anwendung passiver Impfungen.<sup>20</sup> Bei Verabreichung von hochdosierten intravenös applizierten Immunglobulinen in der Therapie des Kawasaki-Syndroms können Immunglobuline jedoch 6 Monate später immer noch nachgewiesen werden.<sup>26</sup>

Als Ausschlusskriterium in dieser Studie wurde eine laufende Therapie mit Immunglobulinen festgelegt und ein Mindestabstand von 3 Monaten zur letzten Immunglobulingabe gefordert.

### 1.5.2. *Aktive Immunisierung*

Ziel der aktiven Immunisierung ist es, ein Immungedächtnis aufzubauen, das bei Infektion des vorzubeugenden Erregers schnell aktiv wird und den Erreger vor Ausbrechen der Krankheit eliminiert. Es stehen verschiedene Arten von Impfstoffen zur Verfügung. Es wird zwischen Tot- und Lebendimpfung differenziert. In der Totimpfung werden Erreger in inaktivierter Form oder Teile bzw. Toxine von Erregern verwendet. Die Lebendimpfung besteht aus abgeschwächten bzw. attenuierten Erregern.

Durch Injektion des Impfstoffs wird eine Immunantwort erzeugt, die spezifisch gegen den Erreger wirkt und ein Zellgedächtnis initiiert. Durch wiederholte Impfungen wird durch klonale Selektion die Bildung hochaffiner und hochpotenter Antikörper indiziert.<sup>11</sup>

Die aktive Immunisierung zu transplantierender und transplantierter Patienten stellt aufgrund der immunsuppressiven Medikation und der schweren Krankheit der Patienten eine Herausforderung dar, die bestimmten Vorschriften unterliegt. Kandidaten für Transplantationen sollten, wenn möglich immer vor Listung zur Transplantation ausreichend geimpft sein.<sup>8,20,27,28</sup> Beobachtungen in der eigenen Kohorte und Berichte aus anderen Studien deuten darauf hin, dass immunsupprimierte Patienten unzureichend auf Auffrischimpfungen reagieren.<sup>20,29,30,31</sup> Weiterhin ist die Immunreaktion vor Transplantation besser als nach der Transplantation.<sup>20,27</sup>

Nach Transplantation sollte frühestens nach 6 Monaten geimpft werden, da in den Monaten davor die Abstoßungsgefahr des Transplantats erhöht ist und die hochdosierten Immunsuppressiva die Immunantwort stärker abschwächen.<sup>8</sup> Das Verabreichen von Lebendimpfstoffen nach Transplantation war lange kontraindiziert.<sup>8,20</sup> Mit steigender Anzahl von Studien zu Lebendimpfstoffen in transplantierten Patienten und Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen und schweren Nebenwirkungen steigt jedoch die Akzeptanz von Lebendimpfungen.<sup>32</sup> Dies sollte jedoch vorerst weiterhin ausschließlich im Rahmen kontrollierter Studien stattfinden.

Laut Duchini et al. lässt sich zusammenfassend Folgendes festhalten: 1.) Die Effektivität der Impfung, gemessen an der Antikörper-Antwort ist herabgesetzt verglichen mit der Antwort normaler Kinder. 2.) Effektiver Schutz der Impfung kann früher verloren gehen. 3.) Sicherheitsprofile sind verändert und spezifische Komplikationen, wie Abstoßung und Organ-Dysfunktion existieren, zumindest theoretisch. 4.) Attenuierte Lebendimpfstoffe sind kontraindiziert. 5.) Die Immunantwort ist am besten, wenn die Impfung vor Beginn der Immunsuppression verabreicht wird.<sup>33</sup>

### 1.6. Pathophysiologie der Transplantatabstoßung

Die Transplantatabstoßung wird differenziert in hyperakute, akute und chronische Abstoßung. Die hyperakute Abstoßung tritt in den ersten Minuten bis Stunden nach Transplantation auf. Die akute Abstoßung kann zu jedem Zeitpunkt nach Transplantation auftreten, wird aber am häufigsten in den ersten Monaten beobachtet.<sup>6</sup> Die chronische Abstoßung ist ein diffuser Prozess, der über Monate bis Jahre fortschreitet und dessen Beginn nicht klar abgrenzbar ist.

Es besteht die Befürchtung durch Impfung eine akute Abstoßung zu induzieren. Ob eine chronische Abstoßung durch eine Impfung beschleunigt werden kann, ist unklar.

Die akute Abstoßung wird durch T-Lymphozyten verursacht, die über die Erkennung körperfremder MHC-Moleküle aktiviert werden. Sie binden an die MHC-Moleküle der körperfremden Zelle, lysieren die Transplantatzellen direkt (CD8<sup>+</sup> Lymphozyten) oder führen durch Aktivierung unspezifischer Abwehrzellen und B-Lymphozyten zu einer Zerstörung der Zellen (T-Helfer-Zellen). Es kommt zu einer rasch progressiven Schädigung des Organs.<sup>11,13</sup> Die chronische Abstoßung manifestiert sich beim Herzen in einer Vaskulopathie des transplantierten Organs. Diese wird durch viele, immunologische und nicht-immunologische Faktoren verursacht.<sup>2,3,6</sup> Die Pathophysiologie ist noch nicht vollständig bekannt. Als nicht-immunologische Faktoren haben unter anderem virale Infektionen, Hyperlipidämie, Hypertension und Immunsuppressiva einen Einfluss auf die Genese.<sup>34</sup> Immunologisch spielen die B-Lymphozyten eine sehr wichtige Rolle.<sup>13,34</sup>

### 1.7. Arten und Wirkmechanismen der Immunsuppressiva

In den meisten Transplantationszentren ist es üblich, direkt postoperativ eine Dreifachtherapie (Calcineurin-Inhibitor, Kortikosteroid und Antimetabolit) zu beginnen.<sup>6,35</sup> Diese Dreifachtherapie ermöglicht es, die akute Transplantatabstoßung in vielen Fällen zu verhindern.<sup>6</sup> In der Regel wird die Steroidtherapie rasch reduziert und im Kindesalter nach ca. 6 Monaten eingestellt.<sup>36</sup> Die Kombination der übrigen Immunsuppressiva wird in den folgenden postoperativen Jahren in reduzierter Dosis beibehalten.<sup>2,3</sup> In seltenen Fällen von frühkindlicher Transplantation erfolgt die Reduktion auf eine Monotherapie mit einem Calcineurin-Inhibitor. Für diese Arbeit stehen die Immunsuppressiva Mycophenolat Mofetil und Tacrolimus im Vordergrund, da sie in der Kohorte vorwiegend eingesetzt wurden. Ihre Wirkweise soll im Folgenden erläutert werden.



### 1.7.1. *Tacrolimus (FK 506)*

Tacrolimus gehört zusammen mit Cyclosporin A in die Medikamentengruppe der Calcineurin-Inhibitoren. Es ist ein Makrolid-Antibiotikum, das aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* gewonnen wird.<sup>11,37</sup>

Die Funktionsweise ist noch nicht vollständig geklärt. Zurzeit wird die Wirkung wissenschaftlich wie folgt beschrieben: Tacrolimus bindet an einen intrazellulären Rezeptor, das Immunophilin. Dieser Komplex lagert sich an das Calcineurin, eine Serin/Threonin-Phosphatase, an. Damit kann es durch Calcium, dessen Konzentration bei T-Zell-Aktivierung in der Zelle steigt, nicht mehr aktiviert werden. Das aktivierte Calcineurin ist verantwortlich für die Dephosphorylierung des zytosolischen Teils des NF-AT (nuclear factor of activated t-cells), welcher danach aus dem Zytosol in den Zellkern translozieren kann. Der zytosolische Teil verbindet sich im Kern mit dem kernspezifischen Teil zu einem Transkriptionsfaktor. Dieser ist notwendig für die Transkription und damit für die RNA- und Protein-Synthese vieler Gene, die für Zytokine und Zelloberflächenrezeptoren kodieren.<sup>11,18</sup> Durch die Blockierung des Calcineurins bleibt daher die Synthese von zahlreichen Zytokinen und Zelloberflächenrezeptoren aus, die für die T-Zellproliferation und die Interaktion mit den B-Zellen essentiell sind, z.B. IL-2, IL-4, und CD40-Ligand.<sup>6,18,38</sup> Auch die Synthese und Expression von CD25 ist unter Tacrolimus eingeschränkt.<sup>39</sup> Desweiteren wird die Funktion der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten und die Proliferation von B-Lymphozyten durch die Blockierung des sIg verhindert. Auch die Funktion der Granulozyten wird durch Tacrolimus eingeschränkt.<sup>11</sup>

Die Medikation mit Tacrolimus muss aufgrund der geringen therapeutischen Breite des Medikaments, der großen inter- und intraindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik und der zu gewährleistenden Compliance überwacht werden.<sup>40,41,42</sup> Diese Überwachung erfolgt über die Kontrolle des Blutspiegels. Der Blutspiegel wird anhand eines Talspiegels ungefähr 12h nach der letzten Tacrolimuseinnahme gemessen.<sup>42</sup> Die Dosen werden solange angepasst, bis der gewünschte Spiegel erreicht ist.

Die Unterschiede in der Pharmakokinetik beruhen zum größten Teil auf dem interindividuell sehr variablen Metabolismus.<sup>40,41</sup> Tacrolimus wird im Körper hauptsächlich in der Leber über das Enzym CYP450 3A abgebaut. Dieses Enzym ist von Mensch zu Mensch unterschiedlich stark aktiv.<sup>42</sup> Weiterhin ist auch die orale Bioverfügbarkeit mit 4-89 % sehr variabel.<sup>42</sup> Daraus folgt, dass Tacrolimus von Patient zu Patient unterschiedlich schnell aufgenommen und abgebaut wird. Jeder Patient benötigt individuelle Dosen von Tacrolimus, um bestimmte Spiegel zu erreichen.

Zu Beginn der Immunsuppression direkt nach Transplantation ist es notwendig das Immunsystem möglichst stark zu unterdrücken, um eine akute Abstoßung zu verhindern.<sup>40</sup> Um dies zu erreichen werden im Klinikum Großhadern für die ersten 6 Monate nach Transplantation Talspiegel zwischen 10-15 ng/ml angestrebt. Die Spiegel werden dann schrittweise bis zu Talspiegel im Bereich von 6-8 ng/ml abgesenkt.

### 1.7.2. *Mycophenolat Mofetil (MMF)*

MMF ist ein Prodrug der Mycophenolsäure (MPA), welche im Körper aus MMF entsteht und als Antimetabolit über verschiedene Mechanismen wirkt.<sup>43</sup> Vorwiegend inhibiert es die Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase und hemmt dadurch die de-novo-Purin-Biosynthese.<sup>43</sup> Dadurch verringert sich das Angebot an Guanosin und Deoxyguanosin-Nucleotiden, was die Proliferation der T- und B-Lymphozyten hemmt. Somit vermindert MPA die zelluläre und humorale Immunantwort und damit die Hauptursachen der akuten und chronischen Abstoßung. Diese und andere Effekte des MPA betreffen im Besonderen die zum Immunsystem gehörigen Zellen, wohingegen die meisten anderen Zellen des Körpers in ihrem Wachstum und ihrer Funktion nicht beeinflusst werden.<sup>43</sup>

Mycophenolat hat eine höhere therapeutische Breite als Tacrolimus. Deshalb, und weil sich der Talspiegel als alleinige Spiegelbestimmung als wenig zuverlässig darstellt,<sup>44,45</sup> wird meist auf Spiegelkontrollen verzichtet. Es werden Körpergewicht-abhängige Mengen verabreicht, die im Verlauf der Immunsuppression nicht vermindert werden müssen.

## 2. Patienten und Methoden

### 2.1. Studiendesign

#### 2.1.1. *Probanden*

Im Rahmen regelmäßiger Blutentnahmen in der kinderkardiologischen Ambulanz im Klinikum Großhadern wurden bei allen herztransplantierten Patienten die Titer gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid ermittelt. Bei Titern unterhalb der sicheren Immunität, Diphtherietiter unter 0,1 IU/ml und/oder Tetanustiter unter 1,0 IU/ml, und/oder bei empfohlener Auffrischimpfung aufgrund der STIKO-Empfehlungen wurden die Patienten angeschrieben und um Teilnahme an der Studie gebeten. Nach Zustimmung mittels Einverständniserklärung wurden die Patienten die die Einschlusskriterien erfüllten in die Studie eingeschlossen.

Die Einschlusskriterien forderten:

- Abstand zur Transplantation mehr als 6 Monate
- Durchführung der Transplantation vor dem 18. Geburtstag
- Titer: entweder Diphtherietiter <0,1 IU/ml  
und/oder Tetanustiter <1,0 IU/ml  
und/oder Indikation zur 10 Jahres-Auffrischimpfung
- keine laufende Immunglobulin-Therapie, Abstand zur letzten IgG-Gabe >3 Monate
- keine akute Infektion
- keine Immundefekt-Erkrankung
- keine gesicherte oder vermutete akute Abstoßung
- Abstand zur letzten Impfung >3 Monate

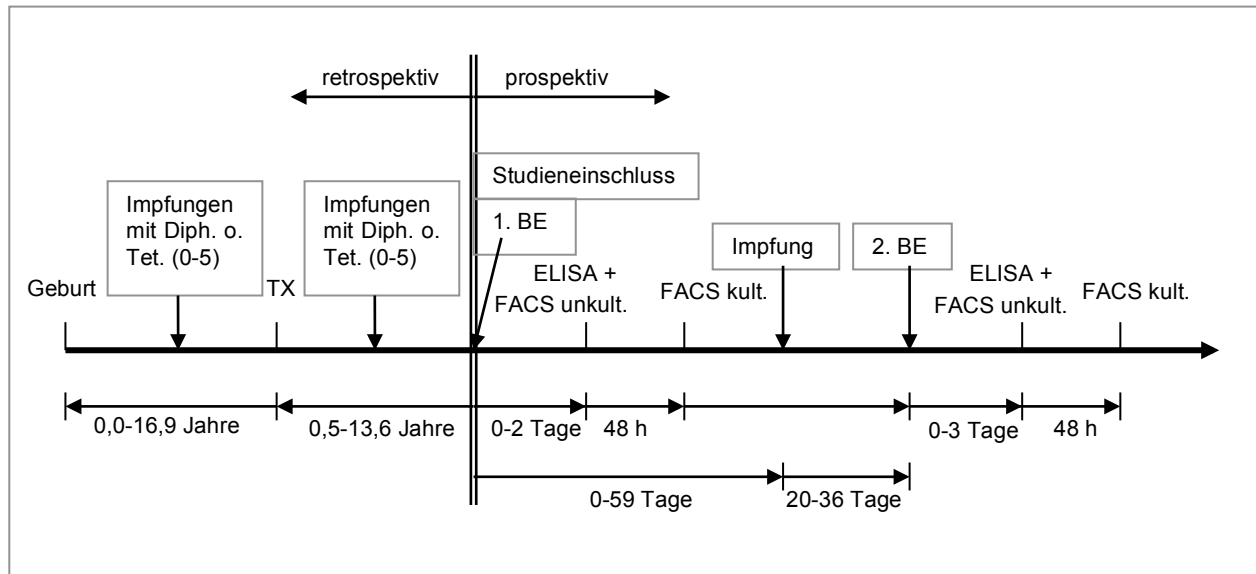
In der Studie wurden von initial 32 Patienten 28 Patienten im Alter von 2,7 bis 21,3 Jahren eingeschlossen, die alle in ihrer Kindheit herztransplantiert wurden und zu diesem Zeitpunkt zwischen 0,0 und 16,9 Jahre alt waren. 24 Patienten sind herztransplantiert und 4 Kinder herz-lungentransplantiert. Von den 28 Patienten waren 6 weiblich (21 %) und 22 männlich (79 %).

**Tabelle 1: Eigenschaften der Patienten**

Gesamtzahl der Patienten		28
Geschlechterverteilung (n [%])	Männlich	22 (79 %)
	Weiblich	6 (21 %)
Gewicht (in kg, Mittelwert [Min-Max])		41,4 (11,3-86,0)
Alter bei Studienbeginn in Jahren (Median [Min-Max])		12,8 (2,7-21,3)
Alter bei Transplantation in Jahren (Median [Min-Max])		6,6 (0,0-16,9)
Zeit seit Transplantation in Jahren (Median [Min-Max])		6,3 (0,5-13,6)
Art der Transplantation (n [%])	HTx	24 (86 %)
	HLT <sub>x</sub>	4 (14 %)
Anzahl der Impfungen vor Transplantation (Median [Min-Max])	Diphtherie	3 (0-5)
	Tetanus	3 (0-5)
Anzahl der Impfungen nach Transplantation (Median [Min-Max])	Diphtherie	1 (0-5)
	Tetanus	1 (0-5)
Anzahl der Gesamtimpfungen (Median [Min-Max])	Diphtherie	4 (2-5)
	Tetanus	4 (2-5)
Zeitintervall seit letzter Impfung (in Monaten, Mittelwert [Min-Max])		50,5 (5,3-198,1)
Anzahl vorangegangener Immunglobulingaben (n der Patienten [%])	IvIG	9 (32 %)
	HyperIgG	5 (18 %)
Zeitintervall seit letzter Immunglobulingabe (in Monaten, Mittelwert [Min-Max])	IvIG	10,5 (4,3-49,6)
	HyperIgG	27,5 (8,5-58,8)

4 Patienten mussten sekundär aus der Studie ausgeschlossen werden. Bei 2 Kindern fanden sich vor der Impfung unerklärliche Titeranstiege, ein Kind bekam während des Studienablaufs Immunglobuline und bei einem weiteren Patient war die erste Blutentnahme aufgrund eines Abnahmefehlers nicht verwertbar. Deshalb konnten keine Aussagen über den Immunstatus direkt vor Impfung getroffen werden, was einen Studienausschluss notwendig machte. Nummerierungen der Patienten bis S34 sind dadurch zu erklären, dass zwei Personen, die nicht an der Studie teilgenommen haben, versehentlich Studienzahlen zugeteilt wurden.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München als ethisch unbedenklich eingestuft.

2.1.2. *Probengewinnung und Ablauf des klinischen Teils***Abbildung 1: Zeitplan der Studie**Protokollplan:

- Tag 0:
- Blutentnahme und Impfung
  - Transport des Bluts ins Labor
  - FACS-Analyse der unkultivierten Zellen und ELISA
  - Beginn der Kultivierung und Stimulierung der Lymphozyten
- Tag 0-14:
- Ausfüllen des Tagebuches durch die Eltern und/oder Patienten
- Tag 2:
- FACS-Analyse der kultivierten und stimulierten Zellen
- Tag 28:
- 2. Blutentnahme
  - Transport des Bluts ins Labor
  - FACS-Analyse der unkultivierten Zellen und ELISA
  - Beginn der Kultivierung und Stimulierung der Lymphozyten
- Tag 30:
- FACS-Analyse der kultivierten und stimulierten Zellen

**Tabelle 2: Daten zum Protokollplan**

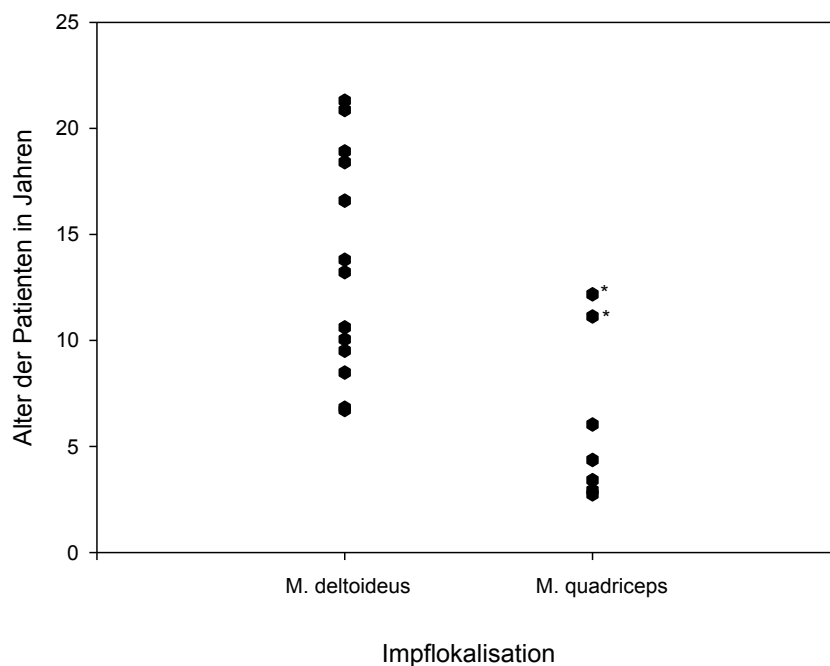
Zeitspanne	In Tagen (Median [Min-Max])
Von 1. Blutentnahme zur FACS-Analyse	0 (0-2)
Von 1. Blutentnahme zur Impfung	0 (0-59)
Von Impfung zur 2. Blutentnahme	28 (20-36)
Von 2. Blutentnahme zur FACS-Analyse	1 (0-3)

Am Tag 0 wurde im Rahmen einer Routinevorstellung in der Kinderkardiologischen Ambulanz bzw. in einer Hausarzt-/Kinderarztpraxis 1-4 ml Blut in ein Serumröhrchen und 2-10 ml Blut in ein Natrium-Heparin-Röhrchen abgenommen. Zudem wurde die Anamnese erhoben und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Anschließend wurden die Patienten gemäß der STIKO-Empfehlungen geimpft. Zudem erhielten die Patienten ein Tagebuch, anhand dessen sie 14 Tage lang Nebenwirkungen der Impfung beobachteten und dokumentierten.

Die erste Blutentnahme fand bei 82 % (n = 23) in der kinderkardiologischen Ambulanz im Klinikum Großhadern statt, bei 11 % (n = 3) in der Hausarzt-/Kinderarztpraxis und bei 7 % (n = 2) in einem anderen Krankenhaus.

Die Blutproben wurden vom Klinikum Großhadern direkt in das Infektionsimmunologische Labor im Dr. von Haunerschen Kinderspital gebracht und dort am selben Tag untersucht. Das Blut aus Praxen und anderen Krankenhäusern wurde per Post geschickt und wurde 0-2 Tage später verarbeitet. Zusätzlich zu den Blutproben der Patienten wurde in Praxen und anderen Krankenhäusern zusätzlich Blut von gesunden Erwachsenen abgenommen und an das Labor versandt, um eine Beeinträchtigung der Blutproben durch den Transport gegebenenfalls nachweisen zu können. Als Kontrolle zu den Blutentnahmen aus Großhadern stand Blut aus dem Infektionsimmunologischen Labor im Dr. von Haunerschen Kinderspital zur Verfügung, das als Tageskontrolle untersucht wurde um Fehler bei den experimentellen Tests ggf. ermitteln zu können. Aus Serum wurden die Titer gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid ermittelt und aus heparinisiertem Vollblut die Lymphozyten für weitere Untersuchungen separiert. Der Abstand zwischen der ersten Blutentnahme und dem Untersuchungsbeginn im Labor betrug im Median 0 Tage (Minimum: 0 Tage, Maximum: 2 Tage).

Die Impfungen fanden zu 64 % (n = 18) in Großhadern statt, zu 25 % (n = 7) in Hausarzt-/Kinderarztpraxen, zu 7 % (n = 2) in anderen Krankenhäusern und zu 3 % (n = 1) in einer Nachsorgeklinik. Die Impfungen wurden intramuskulär injiziert. Je nach Alter und Statur der Patienten erfolgte die Injektion entweder in den Musculus deltoideus oder in den Musculus quadriceps (Verteilung siehe Abb. 2).



\* diese Patienten wurden wegen einer geringen Muskelmasse aufgrund ihrer Statur und ihres Körpergewichts trotz höherem Alters in den M. quadriceps geimpft.

**Abbildung 2: Impflokalisation in Abhängigkeit vom Alter der Patienten (n = 21)**

Am Tag 28 ( $\pm 8$  Tage) nach Impfung wurde den Patienten erneut dieselbe Menge Blut entnommen und identisch untersucht.

Die Blutabnahmen nach Impfung fanden zu 57 % (n = 16) in Hausarzt-/Kinderarztpraxen statt, zu 29 % (n = 8) in der Kinderkardiologischen Ambulanz in Großhadern, zu 11 % (n = 3) in anderen Krankenhäusern und zu 3 % (n = 1) in einer Nachsorgeklinik. Daher wurden mehr Proben versandt. Der Abstand von der zweiten Blutabnahme zu dem Beginn der Untersuchung im Labor betrug im Median 1 Tag (Minimum: 0 Tage, Maximum: 3 Tage). Der Abstand zwischen 2. Blutentnahme und FACS-Analyse war signifikant länger als der Abstand zwischen der 1. Blutentnahme und der FACS-Analyse ( $p < 0,01$ ).

Zum Ende der Studie wurden die Patienten schriftlich über ihre Ergebnisse und über ein weiteres Vorgehen in Abhängigkeit von den Werten informiert.

### 2.1.3. *Impfstoffe*

Die Kinder wurden gemäß STIKO-Empfehlungen geimpft. Die Impfprophylaxe der Kinder unter sechs Jahren wurde mit dem 6-fach Impfstoff Infanrix hexa (GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Belgien) vervollständigt und die der Kinder über 6 Jahren mit dem Impfstoff Boostrix (GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Belgien). Aufgrund individueller Impfschemata, die aus den Impfpässen ersichtlich waren, mussten die Impfungen teilweise individuell angepasst werden.

Daraus ergibt sich der Einsatz anderer Impfstoffe wie Boostrix polio (GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Belgien) u. ä..

68 % der Patienten (n = 19) wurden mit Boostrix (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgien) und 18 % mit Infanrix hexa (n = 5) geimpft. Jeweils ein Patient (jeweils 4 %) wurde mit Boostrix Polio, Infanrix (GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Belgien), Infanrix IPV+Hib (GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Belgien) und TD (Aventis Pasteur MSD GmbH, Leimen, Deutschland) geimpft.

**Tabelle 3: Tabelle mit Auflistung der verabreichten Impfstoffe, mit deren immunogenen Inhaltstoffen.**

Polysaccharide/ Toxoide/ Viren Impfstoffe	Tet	Diph	Pertussis	IPV	Hib	HepB	Bemerkung
<u>Infanrix hexa</u> (GlaxoSmithKline)	X	X	X	X	X	X	Nur bis zum 6. Lj., wegen erhöhten Diphtherie- und Tetanustoxoid-Gehalts
<u>Infanrix IPV+ Hib</u> (GlaxoSmithKline)	X	X	X	X	X		Nur bis zum 6. Lj., wegen erhöhten Diphtherie- und Tetanustoxoid-Gehalts
<u>Infanrix</u> (GlaxoSmithKline)	X	X	X				Nur bis zum 6. Lj., wegen erhöhten Diphtherie- und Tetanustoxoid-Gehalts
<u>Boostrix</u> (GlaxoSmithKline)	X	X	X				
<u>Boostrix polio</u> (GlaxoSmithKline)	X	X	X	X			
<u>Td</u> (Aventis Pasteur MSD GmbH)	X	X					

Tet = Tetanustoxoid, Diph = Diphtherietoxoid, Pertussis = Pertussiskomponenten: Filamentöses Hämagglutinin, Pertussistoxoid, Pertactin, IPV = inaktiviertes Poliomyelitisvirus Typ 1-3, Hib = *Haemophilus influenzae Typ B* Polysaccharid, HepB = rekombinantes Hepatitis-B-Oberflächenantigen

Die Impfstoffe Infanrix hexa, Infanrix und Infanrix IPV+ Hib enthalten  $\geq 30$  I.E. an Diphtherietoxoid und  $\geq 40$  I.E. an Tetanustoxoid. Die Impfungen Boostrix, Boostrix polio und Td-Impfstoff enthalten  $\geq 2$  I.E. an Diphtherietoxoid und  $\geq 20$  I.E. an Tetanustoxoid.



#### 2.1.4. *Erhebung der klinischen Patientendaten*

Die klinischen Daten wurden aus Informationen der Anamnese und der körperlichen Untersuchung, aus Impfausweisen, Akten und telefonischen und persönlichen Patientengesprächen anhand eines standardisierten Protokolls erhoben. Des Weiteren wurden Daten zu Nebenwirkungen, Verträglichkeit und zusätzliche Medikamentengaben mit Hilfe eines Tagebuchs gesammelt.

##### 2.1.4.1. Patiententagebuch

Über das standardisierte Tagebuch wurde über eine Zeit von 14 Tagen täglich Informationen zu lokalen, systemischen und kardialen Symptomen abgefragt.

Lokale Symptome wurden evaluiert über Schmerz an der Injektionsstelle, Muskelschmerz, Schwellung und Erythem, Schwellung der Extremität, in die die Impfung injiziert wurde. An systemischen Symptomen wurden Unwohlsein, Einschränkungen der Belastbarkeit, Kopfschmerz, Fieber, Exanthem, unruhiger Schlaf im Tagebuch erfasst. An kardialen Symptomen wurden beschleunigte Atmung und Atemnot abgefragt. Die Einteilung der Schweregrade wurde durch eine subjektive Einschätzung der Patienten oder ihrer Eltern vorgenommen. Es wurde eine Interpretationshilfe zur Schweregradskala zur Verfügung gestellt: leicht: Symptom scheint Patient nicht zu stören, mäßig: Symptom beeinträchtigt Verhalten des Patienten, Schwer: Das Symptom schränkt Patient in Alltagsaktivität massiv ein.

Die Messung der Körpertemperatur wurde axillär vorgenommen und ab einer Temperatur von 37,5 °C in den Fragebogen eingetragen. Schwellungen und Erytheme wurden mittels Maßband vermessen.

## 2.2. Experimenteller Teil

### 2.2.1. *Material*

#### 2.2.1.1. Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Modell</u>	<u>Hersteller</u>
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson
Brutschrank	Heraeus 6000	Heraeus
Pipetten	Eppendorf Research 10-100µl	Eppendorf
	Eppendorf Research 100µl Eppendorf	Eppendorf
	Reference 0,5 -10µl NICHIRYO MODEL 8100	Eppendorf Nichiryo Co.
Wasch- und Extinktionsgerät	MRX Microplate Reader	Dynex technologies

#### 2.2.1.2. Verbrauchsmaterialien:

Pipettenspitzen	Pipettenspitze 200µl, gelb	Sarstedt
	epT.I.P.S. Standard/Bulk 0,5-20 µl	Eppendorf
	Pipettenspitze 1000µl, blau	
Stepper-tips	Stepper-tips autoklavierbar 6 ml	Süd-Laborbedarf GmbH
FACS-Röhrchen	5 ml	Becton Dickinson
Rundbodenplatte	96well, u-form, steril, m. Abdeckplatte	greiner bio-one

#### 2.2.1.3. Lösungen, Chemikalien, Antikörper und Toxoide

FACS-Lösung	FACS-Flow <sup>TM</sup>	Becton Dickinson
Aqua dest.	Aqua dest.	B. Braun
Rinse	FACSRinse	Becton Dickinson
Clean	FACSClean	Becton Dickinson
Tetanustoxoid	Tetanus-Toxoid (3 ml), 00HG 005, Ch.-Nr. 317477	Chiron Behring GmbH & Co.

Diphtherietoxoid	Diphtherie-Toxoid (3 ml), 00HF 005, Ch.-Nr. 316297	Chiron Behring GmbH & Co
Phytohämagglutinin (PHA)	Purified Phytohaemagglutinin 2mg lyophilised	remel Europe Ltd.
Ficoll	Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH
Antikörper	Anti-CD25 PE	Becton Dickinson
	Anti-CD4 PerCP	Becton Dickinson
	Anti-CD8 APC	Becton Dickinson
	Anti-HLA-DR FITC	Becton Dickinson
Phosphate buffered saline (PBS)	PBS-DULBECCO w/o $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG
Lyse-Puffer	1 Einheit FACS™ Lysing Solution	Becton Dickinson
	10 Einheiten Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect
Kulturmedien	<u>R<sub>0</sub>steril</u> : RPMI-1640	Biochrom AG
	<u>R5H</u> : 94 ml RPMI-1640	Biochrom AG
	5 ml Humanserum	
	1 ml Antibiotikum	
Antibiotikum:	Penicillin/Streptomycin 10.000U/10.000 µg/ml	Biochrom AG
ELISA-Kit	Anti-Tetanus Toxoid IgG	The Binding Site
	Enzyme Immunoassay Kit MK010	
	Anti-Diphtheria Toxoid IgG	The Binding Site
	Enzyme Immunoassay Kit MK014	

### 2.2.2. *Ablauf des experimentellen Teils*

Das Blut der Patienten und der Kontrollen wurde nach Eintreffen im Labor unverzüglich verarbeitet. Das Blut aus dem Serumröhrchen wurde zur Titeruntersuchung mittels ELISA und das heparinisierte Blut für Untersuchungen der Lymphozyten vorbereitet.

Aus dem heparinisierten Blut folgte zuerst eine Lymphozytenseparation. Dann wurde ein Teil der separierten Lymphozyten mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und anschließend mittels einer FACS-Analyse untersucht. Ein weiterer Teil der Lymphozyten wurde für eine Kultivierung und Stimulierung vorbereitet. Diese Zellen wurden 48 Stunden kultiviert und stimuliert, anschließend einer Fluoreszenzfärbung und einer darauf folgenden Untersuchung mittels FACS-Analyse zugeführt. Blut von Blutentnahmen vor Impfung und von Blutentnahmen nach Impfung wurde zeitgleich verarbeitet, um Inter-Assay-Schwankungen auszugleichen.

### 2.2.3. *Immunologische Methoden*

#### 2.2.3.1. Lymphozytenseparation

Die Lymphozytenseparation ist ein Verfahren, in dem die Lymphozyten aus Vollblut isoliert werden, um sie weiteren Untersuchungen zu unterziehen. Dieses Verfahren beruht auf einer Auftrennung der Blutzellen anhand eines Dichtegradienten. Als Trennmedium wird, aufgrund seiner günstigen Eigenschaften hinsichtlich Dichte und Viskosität, Ficoll verwendet. Ficoll ist ein Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin.

Die Lymphozytenseparation fand unter sterilen Bedingungen statt.

##### 2.2.3.1.1. Durchführung der Lymphozytenseparation

Das Natrium-Heparin-Blut wurde mit R0-steril verdünnt, auf 3 ml Ficoll aufgeschichtet und 20 min bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. R0-steril ist RPMI-1640, ein Kulturmedium, das auf einem Hydrogencarbonat-Puffer-System und einer Lösung aus Aminosäuren, Glukose, Salzen und Vitaminen basiert.

Der Inhalt des Reagenzglases stellt sich nach dem Zentrifugieren wie folgt dar: Im unteren Teil des Reagenzglases liegen die Erythrozyten und Thrombozyten vor, die darüber liegende meist farblose durchsichtige Schicht bildet das Ficoll. Darüber befindet sich das Plasma. Die Lymphozyten sammeln sich an der Grenze des Ficoll zum Plasma in einem Ring. Dieser Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Reagenzglas gegeben und mit R0 versetzt. Nach Schwenken des Glases und 10 min Zentrifugieren mit 2000 Umdrehungen wurde der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde mit R0 versetzt, gelöst und 10 min bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und 1 ml R0-steril zugegeben. Das entstandene Pellet wurde resuspendiert und im Reagenzglas gut gemischt.

Damit lag eine Zellsuspension mit einem Volumen von 1 ml vor.

Für die Vorbereitung der Lymphozytenstimulierung ist eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^7/\text{ml}$  der zu verwendenden Lösung notwendig, daher muss die Anzahl der Lymphozyten bestimmt werden, um die Herstellung der gewünschten Konzentration zu ermöglichen.

10  $\mu\text{l}$  der Lymphozytenlösung wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Trypanblau (0,5 %) versetzt und die Lösung in einen Objektträger mit Neubauerzählkammer eingegeben. Die Neubauerzählkammer besteht aus 9 Quadraten, die mit einem Raster versehen sind, und fasst ein definiertes Volumen. Die Anzahl der Lymphozyten wurde gezählt. Dabei wurden die 4 Eckquadrate ausgezählt und die ermittelte Anzahl der Lymphozyten durch die Anzahl der Quadrate geteilt. Dabei wurden tote Lymphozyten, die aufgrund von Membrandefekten blau angefärbt werden gesondert gezählt.

Anhand des Verhältnisses gefärbter zu ungefärbter Zellen lässt sich die Vitalität der Zellen in Prozent abschätzen.

Ein Quadrat der Neubauerzählkammer nimmt 0,1  $\mu\text{l}$  Lösung auf. Das heißt in 1  $\mu\text{l}$  ermittelt sich die Anzahl der Zellen wie folgt:

$$\text{Zellanzahl pro } 1 \mu\text{l} = n/V \cdot V_f$$

$n$  = die mittlere gezählte Zellzahl,  $V$  = das Volumen des Quadrates (0,1  $\mu\text{l}$ ) und  $V_f$  = der Verdünnungsquotient.

Der Rest der Lymphozytensuspension wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Auf die verbleibenden Lymphozyten wurde  $n/100$  in ml an R0-steril in das Reagenzglas hinzugegeben und das Pellet darin resuspendiert.

#### 2.2.3.2. Lymphozytenkultivierung und -stimulation

Die Lymphozytenstimulation dient dazu, die Lymphozyten mit spezifischen Antigenen in Kontakt zu bringen, um eine Aktivierung der spezifischen Lymphozyten herbeizuführen. Um dies über längere Zeit durchzuführen, müssen sich die Zellen in Kulturmedium befinden um am Leben zu bleiben.
































Neben den beiden spezifischen Stimulationen mit Diphtherie- und Tetanustoxoid wurden eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle angelegt. Als Negativkontrolle wurden die Lymphozyten ohne Stimulation in Kulturmedium kultiviert. Als Positivkontrolle wurden die Lymphozyten während der Kultivierung mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert.

PHA ist ein Extrakt der roten Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris*), welcher in Untereinheiten Lymphozyten-reaktiv ist. Diese Untereinheiten haben eine hohe Affinität zu Lymphozytenrezeptoren, was die starke mitogene Wirkung des PHA erklärt.

Die Lymphozyten wurden 48 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und stimuliert.

## 2.2.3.2.1. Durchführung der Lymphozytenkultivierung/-stimulierung

Für die Kultivierung in der Rundbodenplatte wird ein Nährmedium-Zell-Gemisch im Verhältnis von 1:10 erstellt. Damit beträgt die Zellkonzentration  $1 \times 10^6/\text{ml}$ . Das Medium für die Kultivierung der Zellen ist R5H. R5H wird aus 94 ml RPMI-1640, 5 ml Humanserum und 1 ml Antibiotikallösung (Penicillin und Streptomycin) hergestellt. Das RPMI-1640 dient als Grundnährmedium. Um sich als Kulturmedium für Lymphozyten zu eignen wird es mit Humanserum versetzt. Das Humanserum enthält unter anderem zusätzlich Spurenelemente, Wachstumsfaktoren und Hormone, muss aber vor Zugabe in das Nährmedium 30 min bei 56 °C inaktiviert werden. Die Nährmedium-Zell-Gemische wurden dann in der Rundbodenplatte wie folgt angelegt:

Beschriftung Mit Studiennummer	Zellen in Kulturmedium => Negativkontrolle	Zellen in Kultur- medium + Diph- therie-Toxoid	Zellen in Kultur- medium + Tetanus-Toxoid	Zellen in Kultur- medium + PHA => Positivkontrolle
Kontrolle 1	 	 	 	 
Kontrolle 2	 	 	 	 
S1	 	 	 	 
S2	 	 	 	 

**Abbildung 3: Schema zur Anlage der Rundbodenplatten zur Kultivierung**

Auf der Rundbodenplatte wurden jeweils vier Spalten angelegt, für die Negativkontrolle, die Positivkontrolle und die beiden spezifischen Stimulationen. Weiterhin wurden 4 Reihen angelegt mit 2 Kontrollen und zwei Patienten mit jeweils 2 Vertiefungen je Person pro Stimulation.

Jede Vertiefung wurde mit 100 µl der Zellkulturen befüllt, was eine Zelldichte von  $1 \times 10^5$  pro Vertiefung ergibt. Anschließend wurden den Vertiefungen, in denen die spezifische Stimulation stattfinden sollte jeweils 100 µl 1(Toxoid):512 (R0-steril) konzentrierte Diphtherietoxoid- bzw. Tetanustoxoid-Lösung zugesetzt. Die Toxoid-Lösungen enthielten 4800 Lf/ml an Tetanustoxoid und 3400 Lf/ml an Diphtherietoxoid. Durch die Verdünnung der Toxoid-Lösungen und das Zugeben zur Zellsuspension liegt eine Ausflockung von 4,69 Lf/ml für Tetanustoxoid und von 3,32 Lf/ml für Diphtherietoxoid vor. Für die Positivkontrolle wurde 100 µl 2 µg/ml konzentrierte PHA-Lösung (in R5H) (Endkonzentration: 1 µg/ml) und für die Negativkontrolle 100 µl R0-steril in jede Vertiefung

hinzugefügt. Anschließend wurden die Rundbodenplatten gerüttelt und für 48h in den Brutschrank gelegt.

### 2.2.3.3. Durchflusszytometrie/FACS-Analyse

#### 2.2.3.3.1. Färbung der Lymphozyten mit an Fluorochrom gebundenen Antikörpern

Die Färbung der Lymphozyten mit Fluorochromen dient dem Nachweis von Antigenen. Diese Antigene können über Antikörper spezifisch mit Fluorochromen markiert und so mit dem Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) gemessen und anschließend ausgewertet werden.

Die Färbung der Lymphozyten erfolgte sowohl bei unkultivierten, als auch bei kultivierten Lymphozyten. Der Ablauf war identisch, weshalb im Folgenden exemplarisch die Färbung der kultivierten Zellen beschrieben wird.

Für die Markierung der Antigene CD4, CD8, CD25 und HLA-DR wurden vier verschiedene an Antikörper gebundene Farbstoffe benötigt, CD4-PerCP (Peridin chlorophyll protein), CD8-APC (Allophycocyanin), CD25-PE (R-Phycoerythrin) und HLA-DR-FITC (Fluorescein Isothiocyanat).

In vier beschriftete Reagenzgläser wurden jeweils 10 µl CD4-PerCP, AntiCD25-PE, HLA-DR-FITC und 5 µl CD8-APC gegeben. Zu den Farbstoffen wurden die ungefähr 400 µl der kultivierten Zellsuspensionen aus je 2 der zusammengehörigen Felder der Rundlochplatte zugefügt: unstimulierte Zellen (Negativkontrolle), mit PHA stimulierte Zellen (Positivkontrolle), mit Diphtherietoxoid stimulierte Zellen und mit Tetanustoxoid stimulierte Zellen. Nach Mischen und 15 minütiger Inkubation in Dunkelheit wurde 2 ml Lyse-Puffer zu der Farbstoff/Zell-Mischung hinzugefügt. Nach Mischen wurde die Lösung 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Dieser Vorgang, insbesondere die Substanz Lyse-Puffer dienen dem Auflösen der eventuell noch vorhandenen Erythrozyten und der Fixierung der Lymphozyten. Nach dem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit bis auf 100 µl abgesaugt und 2 ml PBS hinzugegeben. Dieser Vorgang dient dem Waschen der Lymphozyten. Nach erneutem, 10 minütigen Zentrifugieren mit 1500 Umdrehungen wurde die Flüssigkeit im Reagenzglas wieder bis auf 100µl abgesaugt. Auf die verbleibende Lösung wurden 300 µl PBS hinzugegeben und nach erneutem Mischen wurde die Zelllösung mit dem FACS-Gerät gemessen und anschließend ausgewertet.

#### 2.2.3.3.2. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, in dem durch Verwendung eines Laserstrahls die relative Größe, die relative Granularität und die spezifische Fluoreszenz der zu untersuchenden Zellen bestimmt werden.<sup>46</sup>

Das Gerät FACSCalibur verfügt über 2 Laser, einen blauen Argon-Laser mit 488 nm Wellenlänge und einen roten Dioden-Laser mit 635 nm Wellenlänge.<sup>47</sup> Beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle können zwei Phänomene beobachtet werden. Die Strahlen, die direkt auf die Zelle treffen, werden

gebrochen und reflektiert. Die abgelenkten ( $90^\circ$ ) Lichtstrahlen werden als Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) bezeichnet. Die Lichtbrechung und Reflexion verhält sich proportional zur Granularität.<sup>46</sup>

Die Strahlen, die sich sehr dicht am Rand der Zelle befinden, werden gebeugt. Diese Lichtbeugung ( $0,5-10^\circ$ ) wird als Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) bezeichnet und verhält sich proportional zum Radius<sup>2</sup> einer Kugel und damit der Größe einer Zelle.<sup>46</sup>

Ist die zu untersuchende Zelle via Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) versehen worden, kann zusätzlich zur Zellgröße und –Granularität auch die Fluoreszenz bestimmt werden.<sup>46</sup> Bei dem Durchflusszytometer FACSCalibur können 4 Fluoreszenzen gleichzeitig bestimmt werden. Die Wellenlänge der Fluoreszenz des Farbstoffes ist vom jeweils verwendeten Fluorochrom abhängig. Bei Einfallen eines Laserstrahls einer bestimmten Wellenlänge auf das Fluorochrom absorbiert dieses die Energie und emittiert Licht einer höheren Wellenlänge.<sup>47</sup> Dieses Licht wird mittels eines Photomultiplikators in elektrische Signale umgesetzt und vermittelt so Informationen über die Anzahl der fluoreszierenden Zellen und über die Intensität und Art der Fluoreszenzen.<sup>11</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Fluorochrome in Verbindung mit folgenden Antikörpern verwendet:<sup>47</sup>

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Fluorochrome und deren Eigenschaften**

Antikörper gegen	Fluorochrom	Anregung durch Laser folgender nm	Maximum des Farbspektrum in nm	Breite des Spektrums in nm
CD4	Peridin Chlorophyll Protein (PerCP)	488	695	40
CD8	Allophycocyanin (APC)	635	660	20
CD25	R-Phycoerythrin (PE)	488	575	26
HLA-DR	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	488	530	30

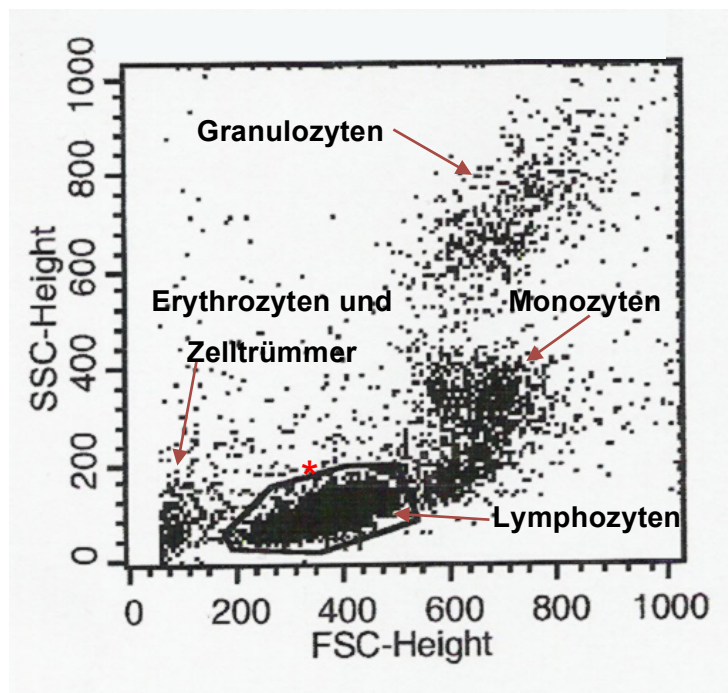
Die Differenzierung der verschiedenen Fluoreszenzen durch das FACS-Gerät erklärt sich mit den verschiedenen Maxima der Farbspektren der einzelnen Fluorochrome. Die Maxima befinden sich in unterschiedlichen Nanometer-Bereichen und können somit unterschieden werden. Da die Wellenlängen der Fluorochrome teilweise überlappen, muss eine rechnerische Kompensation durchgeführt werden.<sup>47</sup>



### 2.2.3.3.3. Auswertung der FACS-Analysen

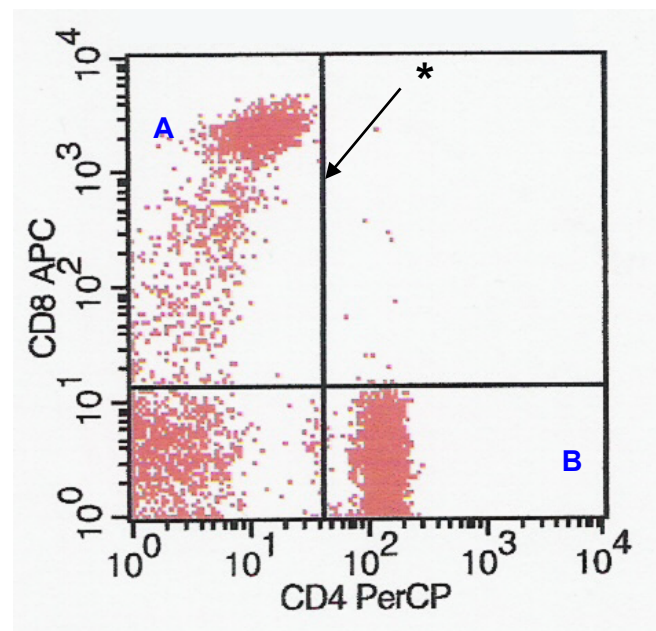
Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte über einen Apple PowerMac G4 mit dem Programm CELLQuest (Becton Dickinson). Die Geräteeinstellungen und die Kompensation der Fluoreszenzen wurden vor Beginn der Studie festgelegt und für alle FACS-Analysen unverändert verwendet.

Nach der Datenaufnahme wurde die zu interessierende Zellgruppe, die Lymphozyten, über die Granularität und Größe bestimmt (siehe Abb. 4). Über ein „Gate“ wurde die Gruppe der Lymphozyten markiert und konnte so im nächsten Schritt separat betrachtet werden.



**Abbildung 4:** FACS-Analyse in Form eines Dotplot, in der die analysierten Zellen nach Zellgröße (FSC, X-Achse) und Granularität (SSC, Y-Achse) aufgeführt werden und je nach Zellbeschaffenheit sich an bestimmten Stellen des Diagramms wieder finden. \* stellt das Gate dar, in dem die Lymphozyten als Gruppe markiert werden.

Mittels der Art der Fluoreszenz und der Intensität konnten dann weitere Untergruppen der Lymphozyten separiert dargestellt und ausgewertet werden (siehe Abb. 5).



**Abbildung 5: Dotplot aus den gateden Lymphozyten nach der Fluoreszenz der an Anti-CD8 und Anti-CD4 gebundenen Fluorochrome APC und PerCP. A = CD8<sup>+</sup> Zellen, B = CD4<sup>+</sup> Zellen, \* = zur Auswertung gesetztes Kreuz zur Abgrenzung der jeweiligen CD-Gruppen**

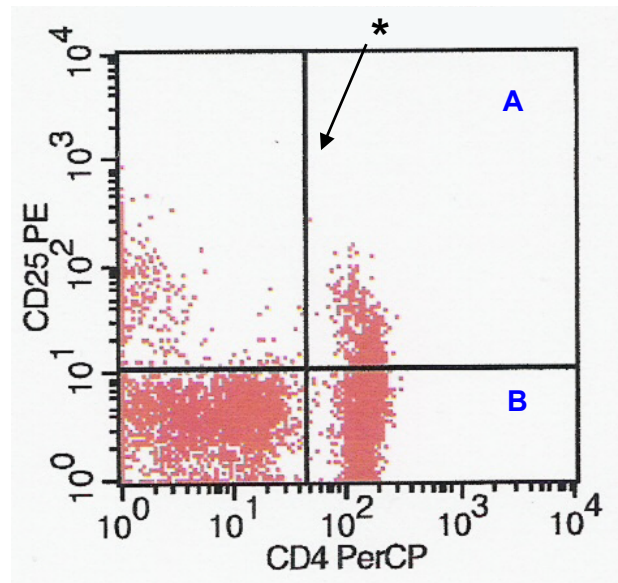
Die weiteren Auswertungen betrachteten die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten jeweils getrennt hinsichtlich der CD25 und HLA-DR-Expression. Die Expression korreliert mit der Fluoreszenz.

Bei der Auswertung der Fluoreszenz wurden zwei verschiedene Auswertungen vorgenommen.

Die verschiedenen Arten der Auswertungen werden exemplarisch an dem Beispiel der CD25-exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten graphisch erklärt.

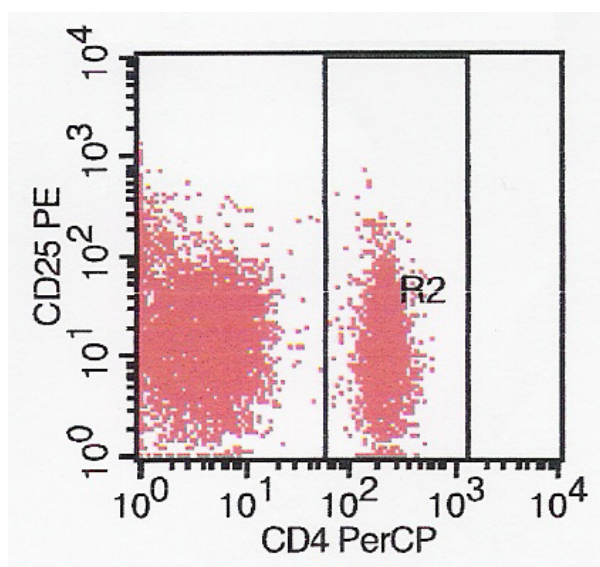
Die erste Auswertungstechnik beschreibt den Anteil der exprimierenden Zellen und die zweite Auswertungstechnik beschreibt die Intensität der Expression über alle Zellen. Die erste Auswertungstechnik beruht darauf, dass die zu betrachtende Zellpopulation (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Lymphozyten) anhand der Expression der Oberflächenantigene in zwei Gruppen geteilt wird (siehe Abb. 6).

Es wurden die CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (X-Achse) gegen die HLA-DR bzw. CD25<sup>+</sup> Zellen (Y-Achse) aufgetragen und ein Kreuz gelegt, welches zuvor in der Negativkontrolle definiert und festgelegt wurde. Das Kreuz grenzt die Gruppen voneinander ab.

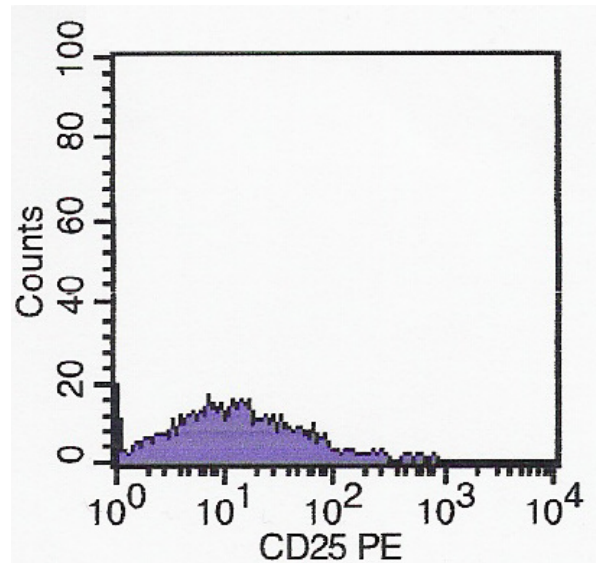


**Abbildung 6:** Dotplot der Lymphozyten nach der Fluoreszenz der mit Anti-CD25 und Anti-CD4 verbundenen Fluorochrome PE und PerCP. A = CD25-positive CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, B = CD25 negative CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, \* = Zur Auswertung gesetztes Kreuz zur Abgrenzung der jeweiligen CD-Gruppen

Die zweite Auswertungstechnik beurteilt die gesamten CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Lymphozyten hinsichtlich der Intensität der Fluoreszenz der markierten Oberflächenantigenen. Die Fluoreszenz korreliert mit der Oberflächenantigenexpression. Die gesamten CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden gated (siehe Abb. 7) und in einem Diagramm als Histogramm abhängig von der Fluoreszenz des an Anti-CD25 bzw. Anti-HLA-DR gebundenen Fluorochroms dargestellt (siehe Abb. 8). Aus diesem Histogramm wurde der Median der Fluoreszenz errechnet, mit dem dann statistisch gearbeitet wird.



**Abbildung 7:** Dotplot der Lymphozyten nach der Fluoreszenz der mit Anti-CD25 und Anti-CD4 verbundenen Fluorochrome PE und PerCP. R2 = ein festgelegtes Gate, das die gesamte Population der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten umfasst.



**Abbildung 8:** Histogramm der als R2 getageten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Abhängigkeit zu der Fluoreszenz des an Anti-CD25 gebundenen Fluorochrom PE

Diese Auswertungen wurden für die unkultivierten Lymphozyten, für die kultivierte Negativkontrolle, die kultivierte Positiv-Kontrolle und für die beiden spezifischen Stimulationen angefertigt, sowohl vor der Impfung, als auch nach der Impfung.

#### 2.2.3.4. Titerbestimmung im ELISA-Verfahren

Das ELISA-Verfahren (Enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein immunologisches Verfahren, in dem ein Substrat durch eine enzymatische Farbreaktion quantitativ gemessen werden kann.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit dem Antigen beschichtet, dessen antagonistischer Antikörper bestimmt werden soll. Die Antikörper aus dem Serum binden an die Antigene. Anschließend wird ein Anti-IgG-Antikörper zugegeben, der an die konstante F<sub>c</sub>-Region der IgG-Antikörper bindet. Dieser Anti-IgG-Antikörper ist mit einem Enzym verbunden, welches eine Farbreaktion katalysiert, deren resultierende Farb-Intensität gemessen werden kann.<sup>11</sup> Es wird somit eine Antikörperkonzentration ermittelt. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Titern um eine funktionelle Untersuchung, die in Logstufen durchgeführt wird. Da im klinischen Gebrauch anstelle der Antikörperkonzentration der Begriff Titer verwendet wird, wird im Folgenden von Titern gesprochen, obwohl es sich nicht im klassischen Sinne um Verdünnungsstufen handelt.

#### 2.2.3.4.1. Durchführung der Titerbestimmung im ELISA-Verfahren

Das zu untersuchende Blut wurde in einem Serum-Röhrchen transportiert. Um das reine Serum zu erhalten, wurden die Röhrchen zentrifugiert und das Serum anschließend isoliert.

10 µl des Serums jeder Probe wurde mit 1000 µl Probendiluens verdünnt (1:100) und gut gemischt.

In eine Mikrotiterplatte wurden 100 µl von jedem Standard mit bekannter Konzentration, jeder Kontrolle und jeder verdünnten Probe in die vorgesehene Vertiefung pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit binden bereits die Antikörper an die Toxoide, mit denen die Vertiefungen beschichtet sind.

Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit 250-350 µl Waschpuffer gewaschen. Sorgfältiges Waschen ist wichtig, um die ungebundenen Antikörper und andere Proteine zu entfernen und um präzise Testergebnisse zu erhalten. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Vertiefungen durch leichtes Klopfen auf eine saugfähige Unterlage getrocknet.

Anschließend wurde 100 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettiert. Das Konjugat bestand aus affinitätsgereinigtem, mit Peroxidase markiertem Kaninchen Anti-Human-IgG. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur über 30 Minuten. In dieser Zeit bindet sich das Anti-Human-IgG an die bereits gebundenen Antikörper.

Erneut erfolgte gründliches Waschen.

Nach dem Waschen wurden jeweils 100 µl Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) in jede Vertiefung pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde 30 Min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.

3,3',5,5'-Tetramethylbinzidin (TMB) wurde von der gebundenen Peroxidase in ein blaues Reaktionsprodukt umgesetzt. Die optische Dichte der Farbreaktion ist proportional zur Antikörperkonzentration der Probe. Diese Reaktion wurde anschließend gestoppt, indem in jede Vertiefung 100 µl 3-molarer Phosphorsäure zugegeben wurde. Die Farbe schlug von blau nach gelb um. Die Intensität des gelben Reaktionsproduktes verhält sich wie das vorherige blaue Reaktionsprodukt proportional zur Antikörperkonzentration.

Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Vertiefungen mit einem Mikrotiterplatten-Leser innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmt.

Die ermittelten Werte wurden dann nach einer Referenzkurve beurteilt, die anhand der Standardverdünnungsreihe erstellt wurde, die im Enzyme-Immunoassay-Kit der Firma The binding site mitgeliefert wurde.

Die minimalen Titer, die anhand des Assay detektiert werden konnten, lagen bei 0,004 IU/ml gegen Diphtherie- und 0,01 IU/ml gegen Tetanustoxoid. Die oberen Grenzwerte des Assay lagen bei 3,0 IU/ml für die Titer gegen Diphtherie- und 10 IU/ml für die Titer gegen Tetanustoxoid. Die Grenzen der Titer für einen ausreichenden Impfschutz ohne Indikation zur Auffrischimpfung sind im Infektionsimmunologischen Labor des Dr. von Haunerschen Kinderspital auf 0,1 IU/ml gegen Diphtherie- und auf 1,0 IU/ml gegen Tetanustoxoid festgelegt.

### 2.3. Statistik

Die Studie ist eine prospektive Kohortenstudie ohne Kontrollgruppe. Die Effekte der Impfungen wurden mit publizierten Daten verglichen. Zusätzlich zu der prospektiven Statistik, die die erworbenen Daten aus dem experimentellen Teil und den Patiententagebüchern verarbeitete, wurden auch retrospektive Daten zur Impfanamnese ausgewertet.

Die Auswertung wurde mithilfe von SigmaPlot™, SigmaStat™ und Microsoft-Excel™ erstellt. In einem Großteil der Daten lag keine Normalverteilung vor, daher wurde mittels nicht-parametrischer Tests ausgewertet.

Vergleiche zweier verbundener Gruppen hinsichtlich einer Eigenschaft wurden mittels Wilcoxon-Test ausgewertet und nur bei  $\geq 7$  Patienten (als minimales Patientenzahlkriterium) angewendet.

Vergleiche zweier unverbundener Gruppen hinsichtlich einer Eigenschaft wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ausgewertet und nur bei  $\geq 7$  Patienten (als minimales Patientenzahlkriterium) angewendet.

Zum Vergleich zweier unverbundener Gruppen hinsichtlich einer Eigenschaft wurden 4-Feldertafeln angelegt, die aufgrund der geringen Patientenzahlen (minimal 2 Patienten) mittels Exact-Fisher-Test ausgewertet wurden.

Vergleiche  $\geq 3$  Gruppen hinsichtlich einer Eigenschaft wurden mittels Kruskal-Wallis-H-Test ausgewertet und nur bei  $> 4$  Patienten (als minimales Patientenzahlkriterium) angewendet.

Zur Auswertung zweier verbundener Gruppen hinsichtlich einer Eigenschaft wurden 4-Felder-Tafeln angelegt, die mittels McNemar-Test ausgewertet wurden.

Korrelationen zweier Eigenschaften wurden mittels Spearman-Korrelationstest ermittelt.

Das Signifikanzniveau wurde auf p-Wert:  $< 0,05$  festgelegt.

Die Graphiken wurden mit SigmaPlot™, Microsoft-Excel™ und Microsoft-PowerPoint™ erstellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Auswertung der Patientendaten

##### 3.1.1. *Körpergewicht*

Das Durchschnittsgewicht der Patienten betrug 41,4 (11,3-86,0) kg. Unter Anwendung der Perzentilen von Kromeyer-Hauschild et al. wurde das Gewicht ausgewertet.<sup>48</sup> 50 % der Patienten (n = 14) befanden sich unter der 10. Perzentile und davon 50 % (n = 7) unter der 3. Perzentile. Das Gewicht korrelierte signifikant positiv mit dem Alter (KK: 0,903, p-Wert: <0,01).

##### 3.1.2. *Indikation zur Transplantation*

Die erworbenen und angeborenen Herz- und Lungenerkrankungen der Studienteilnehmer, die zu einer Transplantation führten waren vielfältig.

**Tabelle 5: Transplantationsbedürftige Herz- und Lungenerkrankungen (n = 28)**

Erkrankungen	Anzahl der Pat.	in Prozent
Dilatative Kardiomyopathie <sup>1</sup>	7	25 %
Hypoplastisches Linksherzsyndrom <sup>1</sup>	4	14 %
Andere komplexe Herzfehler <sup>1</sup>	3	11 %
Myokarditis <sup>1</sup>	3	11 %
Restriktive Kardiomyopathie <sup>1</sup>	2	7 %
Primäre pulmonale Hypertonie <sup>2</sup>	2	7 %
Kawasaki-Syndrom <sup>1</sup>	1	4 %
Desminopathie <sup>1</sup>	1	4 %
Mitochondriopathie <sup>1</sup>	1	4 %
Arrhythm. Rechtsventr. Dysplasie <sup>1</sup>	1	4 %
Shone-Komplex <sup>1</sup>	1	4 %
Pulmonalatresie <sup>2</sup>	1	4 %
pulmonary veno occlusive disease <sup>2</sup>	1	4 %
n	28	100 %

<sup>1</sup> Ursache einer Herztransplantation

<sup>2</sup> Ursache einer Herz-Lungen-Transplantation

Eine Herztransplantation wurde bei 38 % der Studienteilnehmer aufgrund von Kardiomyopathien (n = 9, davon 78 % dilatativ, 22 % restriktiv) durchgeführt, bei 38 % wegen angeborener Herzfehler (n = 9, davon 44 % hypoplastisches Linksherzsyndrom, 11 % Shone-Komplex, 11 % Desminopathie und 33 % weitere komplexe Herzfehler) und bei 16 % wegen entzündlicher Erkrankungen (n = 4, davon 75 % Myokarditiden und 25 % Kawasaki-Syndrom).

Ursache angeborener Fehler und Erkrankungen, die zu einer Herz-Lungen-Transplantation (n = 4) führten waren zu bei 2 Patienten primäre pulmonale Hypertonien und jeweils bei einem Patient eine pulmonary veno occlusive disease der Lungen und eine Pulmonalatresie (n = 1).

Weitere Erkrankungen der Patienten sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Daten wurden anhand der Patientenakten und nicht direkt am Patienten erhoben. Die kompensierte Niereninsuffizienz wurde über Kreatininwerte von 2-6 mg/dl ohne Symptome einer Niereninsuffizienz definiert



**Tabelle 6: Begleiterkrankungen (n = 25)**

Begleiterkrankungen	Anzahl der Erkrankungen	Prozent aller Patienten
kompensierte Niereninsuffizienz	7	25 %
arterielle Hypertonie	6	21 %
Entwicklungsverzögerung	6	21 %
Hörschwäche	4	14 %
Migräne	2	7 %
Minderwuchs/Gedeihstörung	2	7 %
Hyperurikämie	2	7 %
Situs inversus/Heterotaxiesyndrom	2	7 %
Z.n. Krampfanfall	2	7 %
Hypercholesterinämie	2	7 %
atopisches Ekzem	2	7 %
Epilepsie	1	4 %
habituelle Polydipsie	1	4 %
Z.n. Hypospadie	1	4 %
Lactose- und Glutenintoleranz	1	4 %
Nierenagenesie einseitig	1	4 %
Z.n. Asthma	1	4 %
Hydrocephalus	1	4 %
Wachstumshormonmangel	1	4 %
Strabismus	1	4 %
Adenoide	1	4 %
Hirsutismus	1	4 %
Bronchiolitis obliterans	1	4 %
normochrome Anämie	1	4 %
Osteochondrosis dissecans	1	4 %
Vorhofflattern	1	4 %
Z.n. cerebraler Ischämie	1	4 %
Carvajal-Syndrom	1	4 %
terminale Niereninsuffizienz	1	4 %
Desminopathie	1	4 %
Z.n. Hashimoto-Thyreoiditis	1	4 %
Osteoporose	1	4 %
Robertsonsche Translokation	1	4 %
Waschzwang	1	4 %
Polyneuropathie	1	4 %
n = 25	61	

Es gab Mehrfachnennungen der Patienten: Von 28 Patienten zeigten 25 Patienten Begleiterkrankungen.

8 Patienten litten an einer Begleiterkrankung, 9 Patienten an 2 Begleiterkrankungen, 3 Patienten an 3 Begleiterkrankung, 1 Patient an 4 Begleiterkrankungen, 2 Patienten an 5 Begleiterkrankungen und 2 Patienten litten an 6 Begleiterkrankungen.

### 3.1.3. *Medikamentöse Therapie*

Im Vordergrund der medikamentösen Therapie der Patienten unserer Kohorte stand die Therapie mit Immunsuppressiva. Als immunsuppressive Medikamente wurden bevorzugt Tacrolimus (FK) und Mycophenolat Mofetil (MMF) in Kombination eingesetzt. Alternativ erfolgten auch Gaben von Cyclosporin, Azathioprin und Sirolimus (siehe Tab. 7). 4 Patienten erhielten eine Dreifachtherapie mit Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil und Steroid.

**Tabelle 7: Immunsuppressive Medikation der Patienten (n = 28)**

	Anzahl der Patienten	in Prozent
FK und MMF	14	50 %
Dreifachtherapie	4	14 %
nur FK	4	14 %
Cyclo und MMF	2	7 %
FK und Aza	2	7 %
MMF und Sir	1	4 %
FK und Sir	1	4 %
n	28	100 %

**Tabelle 8: Angaben zu den verabreichten immunsupprimierenden Medikamenten**

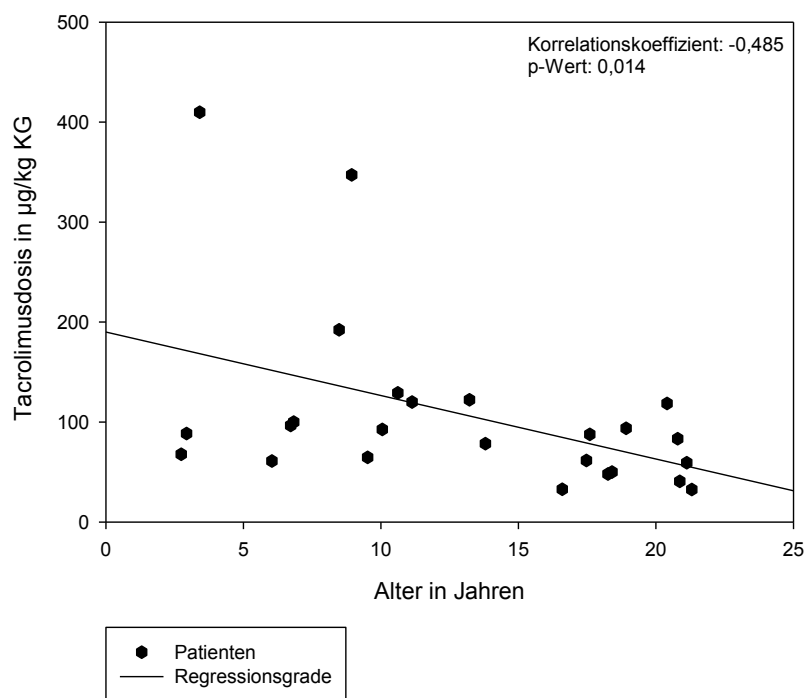
Art des immunsupprimierenden Medikaments	Anzahl der Pat.	Mediane Dosis/d (Min-Max)	Medianer Spiegel (Min-Max)
Tacrolimus	25	87,7 µg/kg KG (32,5-409,8)	7 ng/ml (6-11)
Mycophenolat Mofetil	21	24,5 mg/kg KG (8,8-61,5)	-
Cyclosporin	2	3,83 mg/kg KG (3,35-4,31)	110 ng/ml (100-120)
Azathioprin	2	0,73 mg/kg KG (0,68-0,77)	-
Sirolimus	2	37,9 µg/kg KG (16,9-58,8)	6,25 ng/ml (5-7,5)
Steroide	5	48,1 µg/kg KG (15,4-117,6)	-

### 3.1.4. *Medikation mit Immunsuppressiva und deren Abhängigkeit von Variablen*

Die medikamentöse Therapie der Patienten mit Tacrolimus, MMF und Steroiden wurden in Abhängigkeit von mehreren Variablen ausgewertet. Die Auswertung der anderen Immunsuppressiva war aufgrund der kleinen Patientenzahlen nicht sinnvoll. Um die Tacrolimusspiegel auszuwerten, die oft in Konzentrationsbereichen, wie 7-9 ng/dl angegeben werden, wurden Mittelwerte der Bereiche errechnet und diese zur Auswertung verwendet.

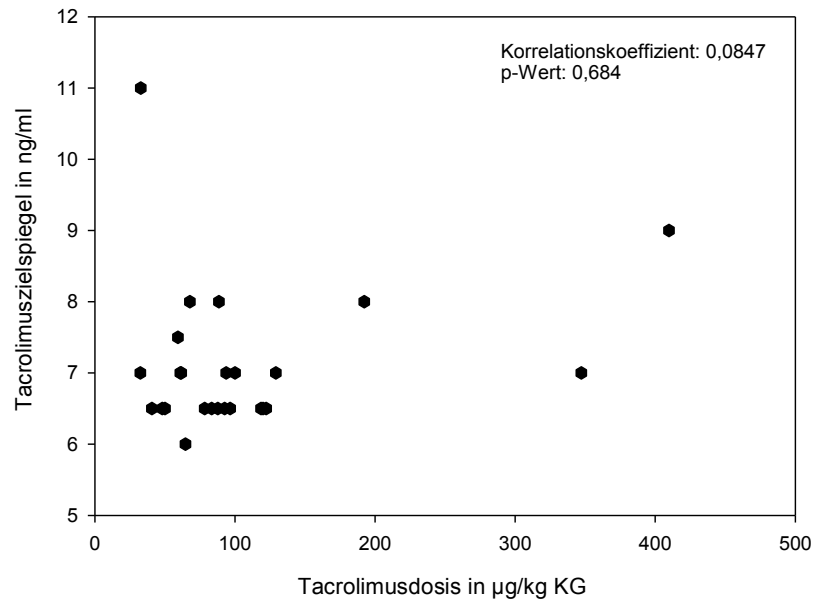
#### 3.1.4.1. Mycophenolat Mofetil und Tacrolimus

Die Mycophenolat Mofetil-Dosis korrelierte nicht signifikant mit dem Alter der Patienten. Die Tacrolimusdosis hingegen korrelierte signifikant negativ mit dem Alter der Patienten (KK: -0,485, p-Wert: 0,014) (siehe Abb. 9).



**Abbildung 9: Korrelation der Tacrolimusdosis mit dem Alter bei Studieneinschluss**

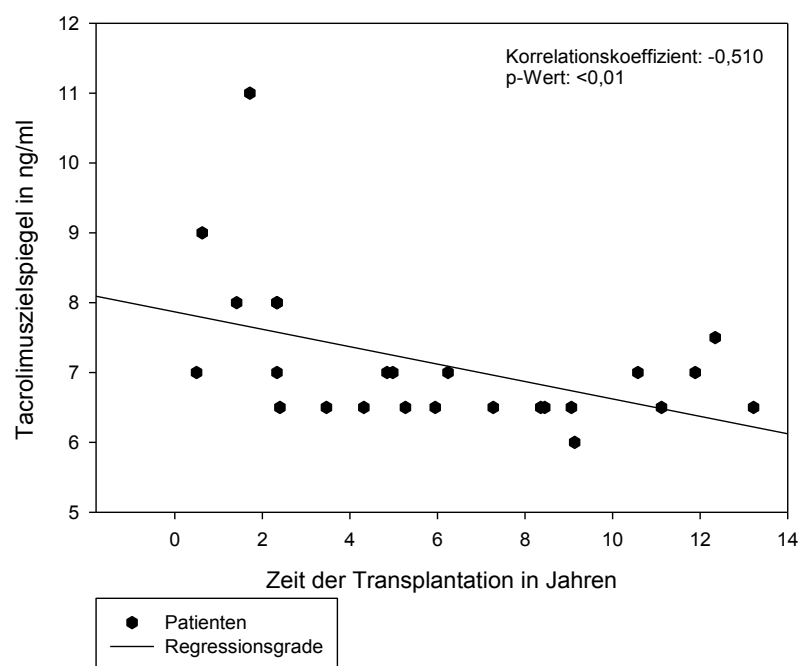
Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die Höhe der Dosen von Tacrolimus. Der Einfluss des Geschlechts auf die MMF-Dosen konnte aufgrund zu kleiner Patientenzahlen nicht untersucht werden. Um die Zusammenhänge zwischen Tacrolimuszielspiegel und Tacrolimusdosis zu untersuchen wurden sie korreliert. Die Korrelation erbrachte keinen Zusammenhang zwischen Tacrolimuszielspiegel und Tacrolimusdosis (siehe Abb. 10).



Diese Graphik zeigt die notwendigen Dosen um die jeweiligen Spiegel zu erreichen. Der Vereinfachung halber wurden Zielspiegel-Bereiche auf Mittelwerte reduziert, wie z.B. 6-8 auf den Mittelwert 7.

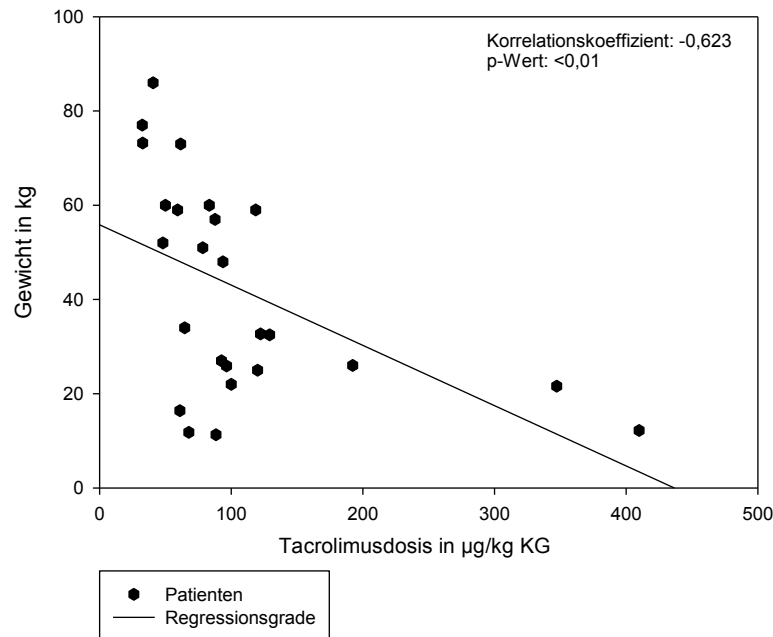
**Abbildung 10: Korrelation der Zielspiegel mit der Dosis von Tacrolimus**

Eine Korrelation der Immunsuppressiva-Dosen hinsichtlich der Zeit seit Transplantation ergab, dass weder die Tacrolimus- noch die Mycophenolat-Dosen mit der Zeit seit Transplantation korrelieren. Die Tacrolimuszielspiegel hingegen korrelierten signifikant negativ mit der Zeit seit Transplantation (KK: -0,510, p-Wert: <0,01) (siehe Abb. 11).

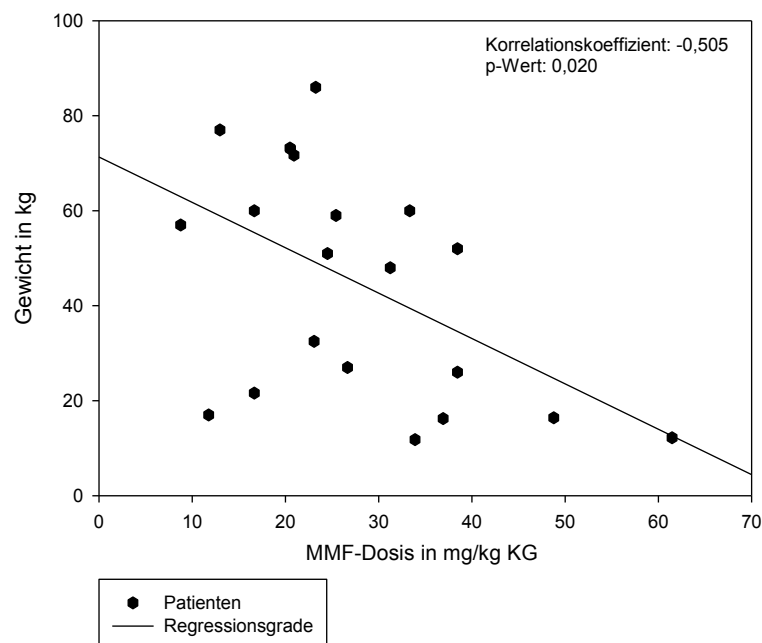


**Abbildung 11: Korrelation der Tacrolimuszielspiegel mit der Zeit seit Transplantation (n = 25)**

Die Tacrolimusdosen, die Tacrolimuszielspiegel und die MMF-Dosen waren nicht abhängig vom Vorliegen einer kompensierten Niereninsuffizienz und von der Art der Transplantation. Eine Korrelation mit dem Gewicht der Patienten mit den Tacrolimuszielspiegeln war nicht signifikant. Die Tacrolimusdosis und die MMF-Dosis korrelierten jedoch signifikant negativ mit dem Gewicht (Tacrolimus: KK: -0,623, p-Wert: <0,01; MMF: KK: -0,505, p-Wert: 0,020) (siehe Abb. 12 und 13).



**Abbildung 12: Korrelation der Tacrolimusdosis mit dem Gewicht der Patienten**



**Abbildung 13: Korrelation der MMF-Dosis mit dem Gewicht der Patienten**

### 3.1.4.2. Steroide

Fünf der Patienten unserer Kohorte erhielten Steroide. Alle 5 Personen sind männlich.

Da 4 der 5 Patienten nach Herz-Lungen-Transplantation die Steroide zur Vorbeugung und Behandlung einer Bronchiolitis obliterans bekamen, bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Art der Transplantation und Medikation mit Steroiden (p-Wert:  $<0,01$ ) (siehe Tab. 9). Patienten nach HLTx bekamen in unserer Kohorte signifikant häufiger Steroide als nach Herztransplantation.

**Tabelle 9: Steroideinnahme in Abhängigkeit der Art der Transplantation**

Steroideinnahme	HTx	HLTx	n
ja	1	4	5
nein	23	0	23
n	24	4	28
p-Wert	$<0,01$ (signifikant)		

ausgewertet mittels Fisher Exakt-Test

Ein Patient erhielt aufgrund des zeitl. Abstands zur Transplantation (6 Monate) Steroide im Rahmen einer Dreifachtherapie.

Das mediane Alter der Patienten mit Steroidbehandlung lag bei 18,3 Jahren (10,6-21,1 Jahre), der mediane Zeitraum seit Transplantation lag bei 8,5 Jahren (0,5-12,3 Jahre).

### 3.1.5. *Sonstige Medikamente*

Die Medikation der Patienten umfasste neben der immunsuppressiven Therapie auch eine Medikation von Begleiterkrankungen und Nebenwirkungen der Immunsuppressiva (siehe Tab. 10).

**Tabelle 10: Verordnungen von Medikamenten zusätzlich zur Immunsuppression (n = 25)**

Medikamente	Anzahl der Verordnungen	Prozent aller Patienten
<u>Mineralien, Elektrolyte, Vitamine &amp; Spurenelemente:</u>	<b>45</b>	
Mg	14	56 %
Vit. D3	10	40 %
Calcium	8	32 %
Iodid	3	12 %
Eisen	2	8 %
Bikarbonat	2	8 %
Fluor	2	8 %
NaCl	1	4 %
Zink	1	4 %
L-Carnitin	1	4 %
Kombinationspräparat	1	4 %
<u>Antihypertensiva:</u>	<b>20</b>	
ACE-Hemmer:	11	44 %
Ca <sup>2+</sup> -Kanalblocker	6	24 %
β-Blocker	3	12 %
<u>Diuretika:</u>	<b>4</b>	
Thiazide	2	8 %
Schleifendiuretika	2	8 %
<u>Hormone:</u>	<b>3</b>	
Thyroxin	2	8 %
Somatotropin	1	4 %
<u>Sonstiges:</u>	<b>10</b>	
Statine	2	8 %
Protonenpumpenhemmer	2	8 %
Antibiotika	2	8 %
Lamotrigin	1	4 %
Allopurinol	1	4 %
Amphotericin B	1	4 %
β <sub>2</sub> -Mimetikum	1	4 %
<b>n = 25</b>	<b>82</b>	

Es gibt Mehrfachnennungen der Patienten: Von 28 Patienten nahmen 25 zusätzlich zur Immunsuppression Medikamente ein. Davon nahmen 4 Patienten 1 zusätzliches Medikament ein, 5 Patienten 2 zusätzlich. Medikamente, 7 Patienten 3 Medikamente, 2 Patienten 4 Medikamente, 4 Patienten 5 Medikamente, 2 Patienten 6 Medikamente und ein Patient 7 Medikamente

Des Weiteren erhielten die Patienten teilweise Immunglobuline der Klasse G (IgG) welche auch spezifische IgG gegen Tetanus- und Diphtherietoxoid enthalten. Die Gaben von IgG wurden retrospektiv über die letzten 5 Jahre erhoben und ausgewertet. Die verabreichten G-Immunglobuline werden in spezifisch angereicherte Immunglobuline gegen Varizellen und CMV (Hyperimmunglobuline, HyperIgG) und Standardimmunglobuline (IvIG) unterschieden. 5 der Patienten unserer Kohorte (18 %) erhielten Hyperimmunglobuline und 9 der Patienten (32 %) Standardimmunglobuline. Die 9 Patienten, die in den letzten 5 Jahren vor Studieneinschluss ivIG erhielten waren alle männlich. Unter den 5 Patienten mit HyperIgG-Gaben waren 2 weibliche und 3 männliche Patienten. Das minimale Zeitintervall zwischen Studieneinschluss und letzter IgG-Gabe wurde vor Studienbeginn auf 3 Monate festgelegt und betrug im Median in unserer Kohorte für ivIG 10,5 (4,3-49,6) Monate und für HyperIgG 27,5 (8,4-58,8) Monate.

### 3.1.6. *Impfstatus*

Zur Beurteilung des Impfstatus jedes Patienten wurden die Empfehlungen der Ständigen Impfkommission der Jahre 1984-2007 verwendet.<sup>49,50,51</sup>

Im Laufe der Jahre änderten sich die STIKO-Impfempfehlungen in Bezug auf die Anzahl der notwendigen Impfungen zum Vervollständigen der Grundimmunisierung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid und in Bezug auf die Zeitpunkte der Impfungen. Während die letzte Impfung der Grundimmunisierung 1984 bis 1991 ab dem 15. Lebensmonat empfohlen wurde, wurde diese 1993 und 1994 im 2. Lebensjahr empfohlen. 1995 wurde die letzte Impfung ab dem 13. Lebensmonat verabreicht, 1997-2000 vom 12.-15. Lebensmonat und seit 2001 vom 11.-14. Lebensmonat. Die Grundimmunisierung gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid bestand 1984-1992 aus 3 Impfungen und besteht seit 1993 aus 4 Impfungen.<sup>49,50,51</sup> Dies wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Analog zu Auswertungen des Robert-Koch-Instituts wurden Kinder im Alter von unter 24 Monaten nicht in der Auswertung der Impfprophylaxe berücksichtigt.<sup>52</sup>

Von 23 Patienten lagen Informationen zum Impfstatus gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid in Form einer Kopie des Impfausweises oder einer Abschrift vor.

Bis zu der Transplantation hatten 43 % der Patienten über 24 Monate (n = 14) die Anzahl an Diphtherie- und Tetanusimpfungen erhalten, die von der STIKO empfohlen wird (siehe Tab. 11).



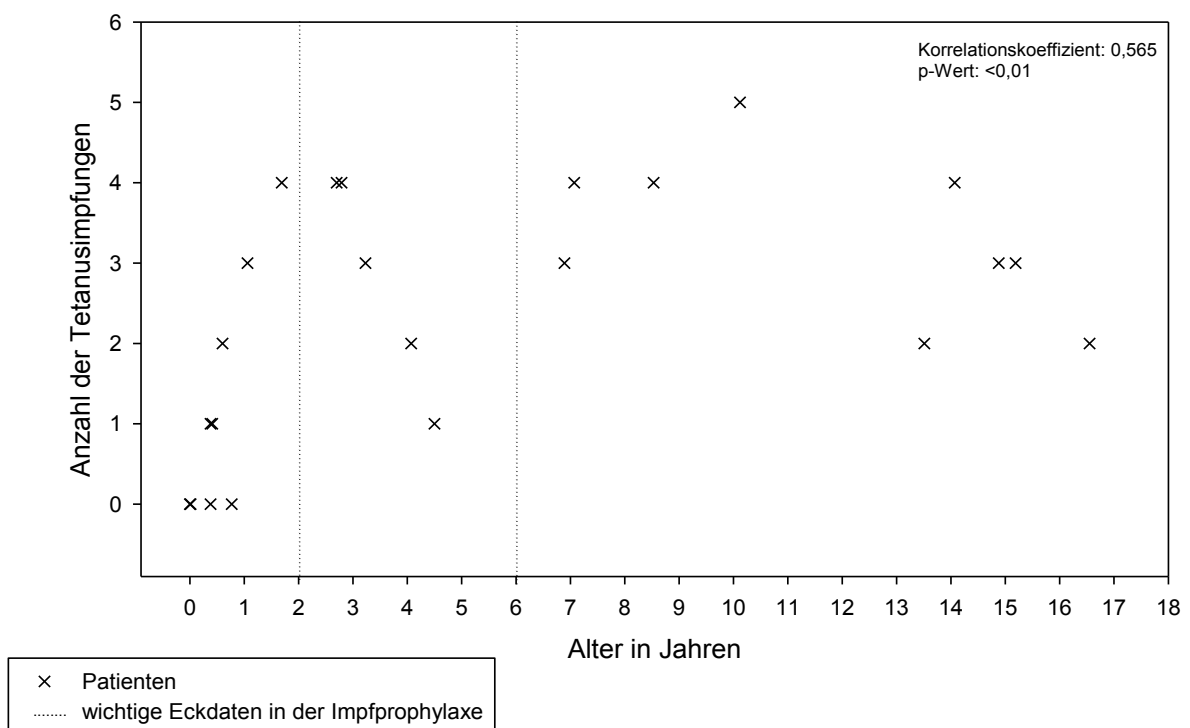
**Tabelle 11: Darstellung der Anzahl der Tetanusimpfungen der Patienten bei Transplantation (n = 14), (nach Impfempfehlungen der STIKO 1984-2007)**

Alter bei Tx	Anzahl der Tetanusimpfungen		n
	ausreichend	nicht ausreichend	
>2-6 Jahre	3 60 %	2 40 %	5 100 %
>6-18 Jahre	3 33 %	6 67 %	9 100 %
n	6 43 %	8 57 %	14 100 %

\* je nach Jahr der Grundimmunisierung der Patienten und der jeweils gültigen Impfempfehlung

Von den verbleibenden 14 Patienten der Studienteilnehmer lagen bei 5 Patienten keine Daten vor und 9 Patienten waren bei der Transplantation unter 24 Monate alt.

Es bestand eine signifikante positive Korrelation der Tetanusimpfungen vor Transplantation mit dem Alter bei Transplantation (KK: 0,565, p-Wert: <0,01) (siehe Abb. 14).



**Abbildung 14: Korrelation der Anzahl der Tetanusimpfungen vor Transplantation mit dem Alter bei Transplantation (n = 23)**

Es wurde weiterhin die Vollständigkeit der Grundimmunisierung gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid vor Transplantation ermittelt. Von den über 2-jährigen Patienten bei Transplantation (n = 14) erhielten 71 % dieser Patienten (n = 10) eine Grundimmunisierung vor Transplantation, bei 29 % der Patienten (n = 4) wurde diese jedoch nicht vollständig durchgeführt.

Es bestand ein Unterschied hinsichtlich des Alters bei Transplantation im Vergleich der Patienten mit erfolgter Grundimmunisierung gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid mit den Patienten ohne erfolgter Grundimmunisierung vor (p-Wert: 0,034) (siehe Tab. 12).

**Tabelle 12: Vergleich der Patienten mit vollständiger Grundimmunisierung vor Transplantation und ohne hinsichtlich des Alters bei Transplantation**

Grundimmunisierung mit Tet und Diph vor Tx	n	fehlend	Median	25 %	75 %
ja	12	0	6,981	2,741	12,093
nein	11	0	0,597	0,379	4,39
n	23		p-Wert: 0,034		

Der Abstand der letzten Impfung korrelierte weder mit dem Titer gegen Diphtherietoxoid vor Auffrischimpfung (p-Wert: 0,075) noch mit dem Titer gegen Tetanustoxoid vor Auffrischimpfung (p-Wert: 0,821).

Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses hatten 48 % der Patienten (n = 11) eine nach STIKO-Empfehlungen ausreichende Anzahl an Tetanusimpfungen erhalten (siehe Tab. 13).

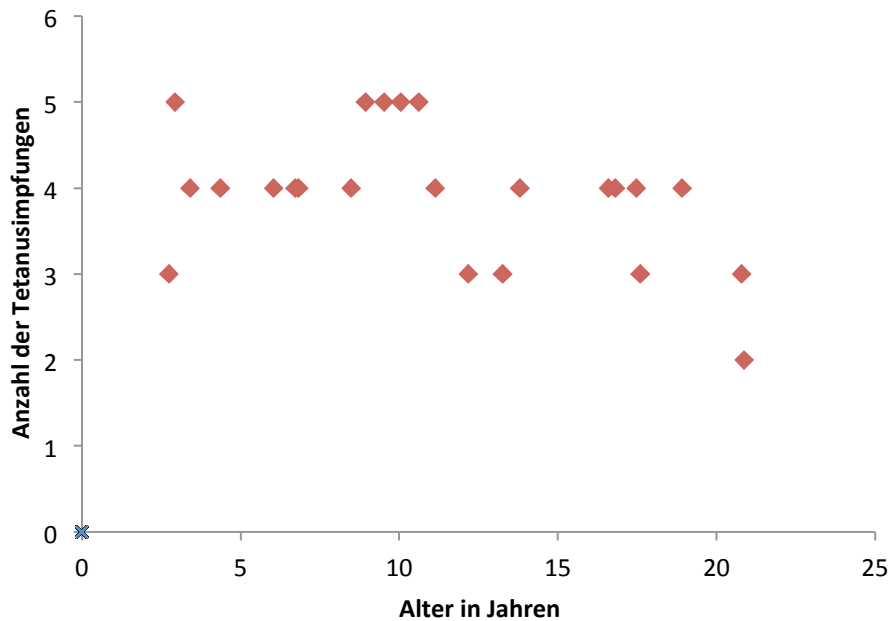
**Tabelle 13: Darstellung der Anzahl der Tetanusimpfungen der Patienten bei Studieneinschluss (n = 23), (nach den Impfempfehlungen der STIKO 1984-2007)**

Alter der Pat.	Anzahl der Tetanusimpfungen		n
	ausreichend	nicht ausreichend	
≤6 Jahre*	4 86 %	1 14 %	5 100 %
>6 – 18 Jahre	7 47 %	8 53 %	15 100 %
>18 Jahre	0 0 %	3 100 %	3 100 %
n	11 48 %	12 52 %	23 100 %

\* alle Patienten waren älter als 24 Monate

Zu Studienbeginn waren alle Patienten bereits geimpft. 1 Patient (4 %) hatte erst 2 Tetanusimpfungen erhalten, 22 % der Patienten (n = 5) hatten 3 Tetanusimpfungen erhalten, 52 % Patienten (n = 12) 4 Tetanusimpfungen und 22 % der Patienten (n = 5) hatten 5 Tetanusimpfungen vor Studieneinschluss erhalten.

Es bestand keine signifikante Korrelation der Anzahl der Tetanusimpfungen vor Studieneinschluss mit dem Alter bei Studieneinschluss (siehe Abb. 15).



**Abbildung 15: Anzahl der Tetanusimpfungen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses**

Für Diphtherie war die Anzahl der Impfungen pro Patient identisch, bis auf einen Patient der vier Tetanusimpfungen, aber nur drei Diphtherieimpfungen erhalten hatte.

Der Abstand zur letzten Impfung betrug im Median 50,5 Monate (5,3-198,1 Monate).

Hinsichtlich der Titer hatten bei Studieneinschluss 39 % der Patienten ( $n = 11$ ) einen unzureichenden Impfschutz gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid, 50 % einen unzureichenden Impfschutz ausschließlich gegen Tetanus- ( $n = 14$ ) und ein Patient (4 %) hatte einen unzureichenden Impfschutz ausschließlich gegen Diphtherietoxoid. 2 Patienten hatten einen ausreichenden Impfschutz gegen beide Toxoide, wurden aber aufgrund anstehender 10-Jahres-Auffrischimpfungen in die Studie mit eingeschlossen.

#### 3.1.6.1. Unerwartete Titeranstiege vor Impfung

In dieser Studie mussten 2 Patienten aufgrund unerklärlicher Titeranstiege zwischen Test und Impfung aus der Studie ausgeschlossen werden (S25 und S29).

Bei einer Routineuntersuchung durch die kinder-kardiologische Abteilung des Klinikum Großhadern wurden beide Patienten als ungeschützt gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid diagnostiziert.

Die Abstände dieser Blutentnahme zur 1. Blutentnahme der Studie betrugen 24 (S25) und 5 (S29) Monate.

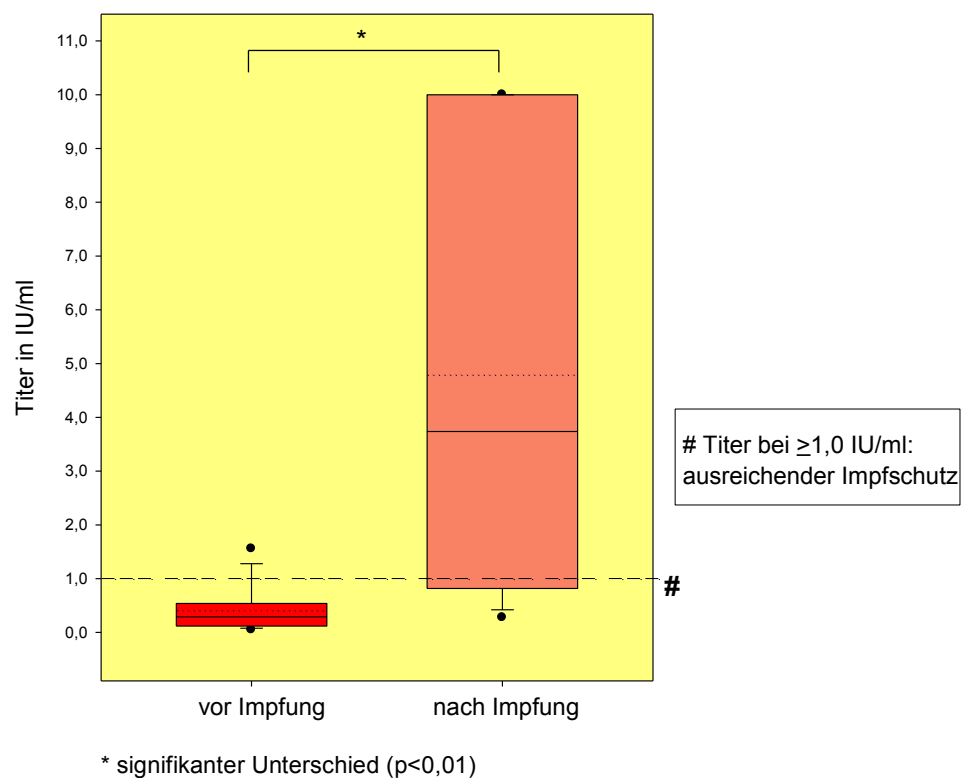
Bei der Blutentnahme vor Studieneinschluss lagen die Antikörperkonzentrationen (Titer) bei S25 gegen Diphtherietoxoid bei 0,153 IU/ml und gegen Tetanus bei 0,109 IU/ml. Bei Einschluss in die Studie lagen die Titer gegen Diphtherie bei 0,553 IU/ml und gegen Tetanus bei  $>10,0$  IU/ml. Bei S29 betrugen die Titer vor Studieneinschluss gegen Diphtherie 0,053 IU/ml und gegen Tetanus 0,405

IU/ml. Bei Studieneinschluss lagen die Antikörperkonzentration gegen Diphtherie dann bei 1,367 IU/ml und gegen Tetanus bei 2,152 IU/ml. Daraus ergeben sich für S25 Titeranstiege von 0,4 IU/ml gegen Diphtherietoxoid und von >9,891 IU/ml gegen Tetanustoxoid und für S29 Titeranstiege von 1,314 IU/ml gegen Diphtherietoxoid und von 1,747 IU/ml gegen Tetanustoxoid.

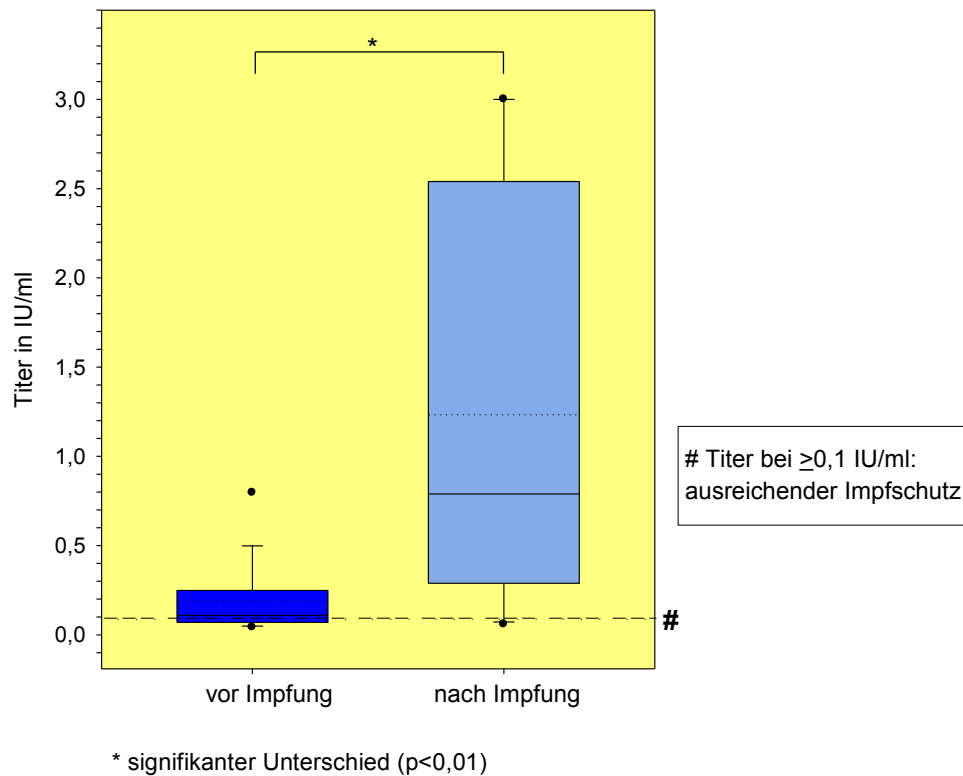
### 3.2. Auswertung des experimentellen Teils

#### 3.2.1. *Humorale Immunantwort auf Impfung*

Nach der Impfung sind die Antikörpertiter sowohl gegen Diphtherietoxoid (p-Wert: <0,01), als auch gegen Tetanustoxoid (p-Wert: <0,01) signifikant höher als vor der Impfung (siehe Abb. 16 und 17).



**Abbildung 16: Tetanustiter im Vergleich vor Impfung und nach Impfung (n = 28)**



**Abbildung 17: Diphtherietiter im Vergleich vor Impfung und nach Impfung (n = 28)**

Nach der Impfung hatten signifikant mehr Patienten protektive Antikörpertiter, sowohl gegen Diphtherietoxoid (p-Wert: 0,013) als auch gegen Tetanustoxoid (p-Wert:  $< 0,01$ ) (Tab. 14). 50 % der Patienten ohne Impfschutz gegen Diphtherie vor Impfung erreichten auch nach Impfung keinen ausreichenden Impfschutz, ebenso 47 % für Tetanus (siehe Tab. 14).

**Tabelle 14: Vergleich des ausreichenden Impfschutzes gegen Diphtherie- ( $> 0,1$  IU/ml) bzw. Tetanustoxoid ( $> 1,0$  IU/ml) bei 28 Patienten vor und nach Impfung**

Ausreichender Impfschutz			nach der Impfung		n
			ja	nein	
Diphtherie	vor der Impfung	ja	16	0	28
			57,1 %	0 %	
		nein	8	4	
		28,6 %	14,3 %		
p-Wert			<b>0,013</b>		
Tetanus	vor der Impfung	ja	3	0	28
			10,7 %	0 %	
		nein	17	8	
		60,7 %	28,6 %		
p-Wert			<b>&lt;0,01</b>		
Auswertung mittels McNemar-Test					

Des Weiteren hatten die Patienten nach der Impfung einen signifikant höheren kombinierten Impfschutz gegen beide Toxoide (Tetanus- und Diphtherietoxoid) (p-Wert: <0,01), durch die erfolgten Mehrfachimpfungen (siehe Tab. 15).

**Tabelle 15: Vergleich des ausreichenden kombinierten Impfschutzes gegen Diphtherietoxoid (>0,1 IU/ml) und Tetanustoxoid (>1,0 IU/ml) bei 28 Patienten vor Impfung und nach Impfung**

Ausreichender Impfschutz gegen Tetanus- und Diphtherietoxoid		nach der Impfung		
		ja	nein	n
vor der Impfung	ja	2 7,1 %	0 0 %	28 100 %
	nein	18 64,3 %	8 28,6 %	
	p-Wert		<0,01	
Auswertung mittels McNemar-Test				

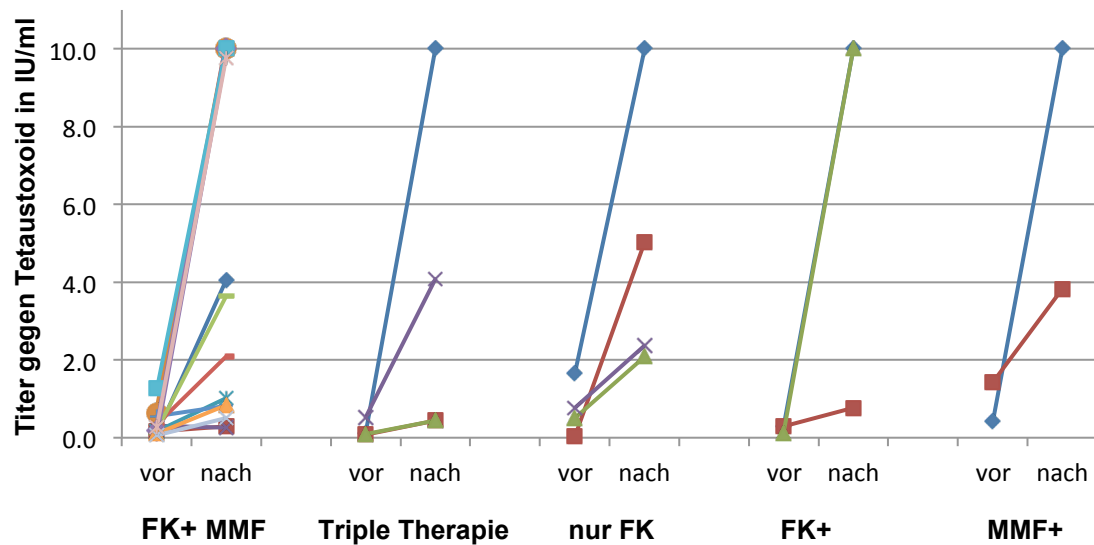
Eine Korrelation der Titer vor Impfung zu den Titern nach Impfung lag nicht vor.

Die Art des Impfstoffes hatte keinen Einfluss auf die Höhe der Titer gegen Diphtherie- oder Tetanustoxoid nach Impfung. Immunglobulingaben vor der Impfung hatten keinen Einfluss auf das Erreichen von protektiven Titern nach Impfung.

Die Gruppen mit oder ohne Grundimmunisierung vor Tx unterschieden sich nicht hinsichtlich der Titer gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid vor Impfung.

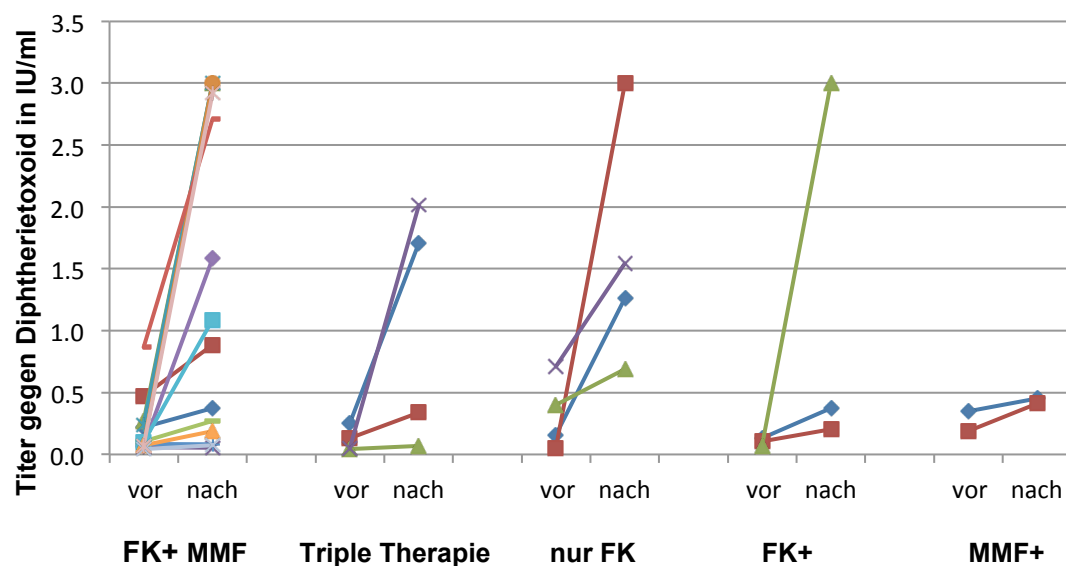
#### 3.2.1.1. Humorale Immunantwort und Einflussfaktoren

Die humorale Antwort des Immunsystems im Vergleich vor zu nach Impfung in Abhängigkeit zur Immunsuppression in graphischer Darstellung (siehe Abb. 18 und 19).



FK+ = FK+ Sirolimus oder Azathioprin, MMF+ = MMF+ Sirolimus oder Cyclosporin

**Abbildung 18: Titer gegen Tetanustoxoid vor und nach Impfung in Abhängigkeit zu der immunsuppressiven Medikation**



FK+ = FK+ Sirolimus oder Azathioprin, MMF+ = MMF+ Sirolimus oder Cyclosporin

**Abbildung 19: Titer gegen Diphtherietoxoid vor und nach Impfung in Abhängigkeit zu der immunsuppressiven Medikation**

Aufgrund der kleinen Patientenzahlen blieb es bei der graphischen Darstellung der humoralen Immunantwort in Abhängigkeit zur immunsuppressiven Therapie. Eine Auswertung mittels statistischer Tests ist aufgrund der kleinen Patientenzahlen nicht sinnvoll.

## 3.2.1.2. Differenz des Titeranstieges von vor zu nach Impfung

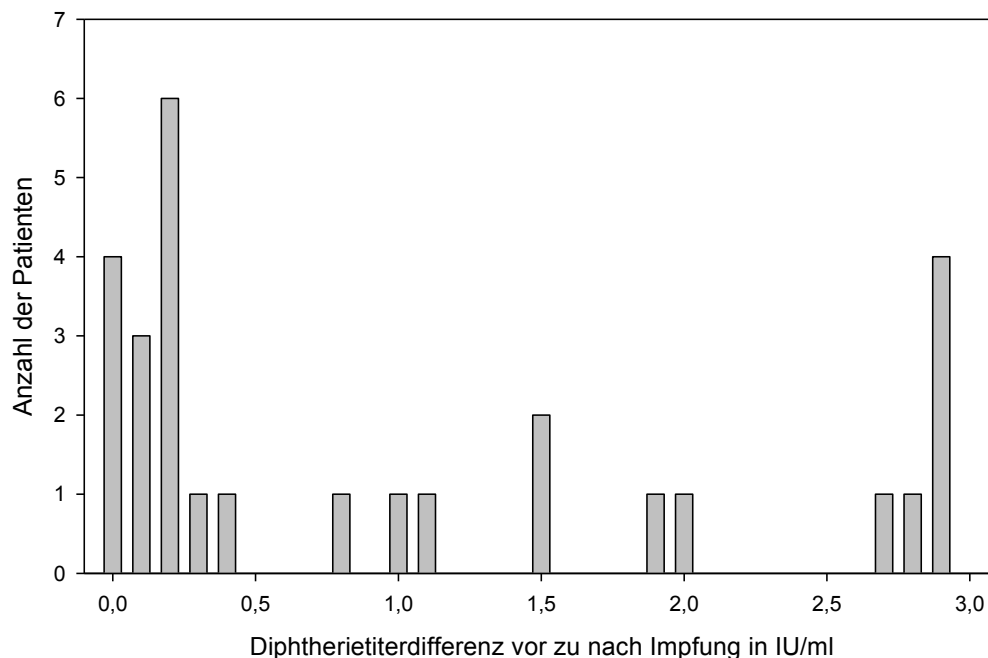
Die Anstiege der Titer in Form von Differenzen der Antikörperkonzentrationen (Titer) gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid vor zu nach Impfung ( $\text{DiffTit}^{\text{Diph}}$  und  $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$ ) wurden wie folgt berechnet:

$$\text{DiffTit} = \text{TitN} - \text{TitV}$$

$\text{DiffTit}$  = Differenz der Titer vor zu nach Impfung

$\text{TitN}$  = Titer nach Impfung

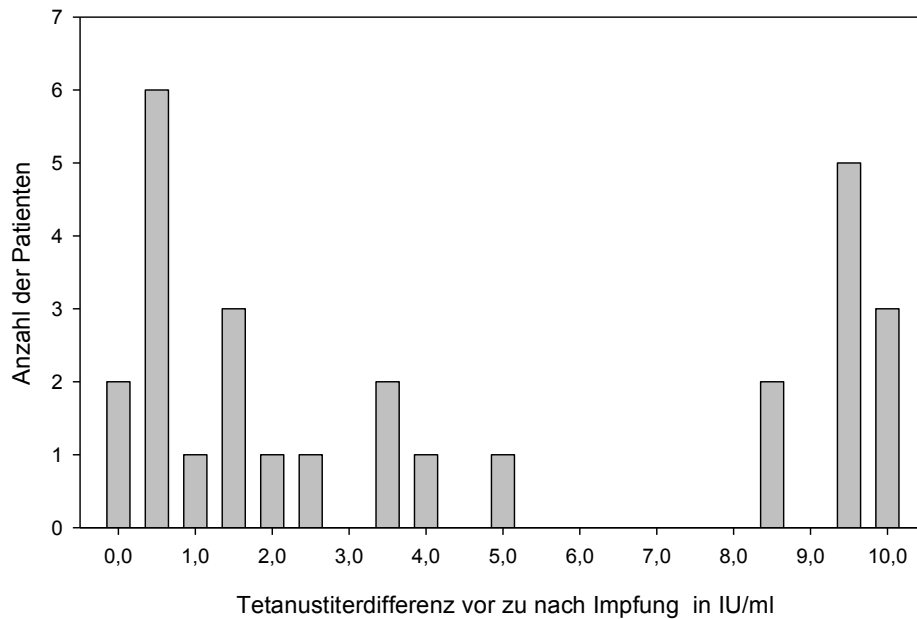
$\text{TitV}$  = Titer vor Impfung



**Abbildung 20: Titeranstiege gegen Diphtherietoxoid als Differenz vor/nach Impfung ( $\text{DiffTit}^{\text{Diph}}$ ) (n = 28)**

Der mediane  $\text{DiffTit}^{\text{Diph}}$  lag bei 0,35 (-0,01-2,95) IU/ml. Es lag keine Abhängigkeit der  $\text{DiffTit}^{\text{Diph}}$  von Geschlecht, Alter bei Studieneinschluss, Gewicht, Art der Impfung, Zeit seit letzter Impfung, Zeit seit Transplantation, Art der Transplantation, Erhalt von Immunglobulinen, Einschränkung der Nierenfunktion, Steroideinnahmen und Alter bei Transplantation vor. Weiterhin bestand keine Abhängigkeit hinsichtlich der FK-Dosis, FK-Zielspiegel und der MMF-Dosis.  $\text{DiffTit}^{\text{Diph}}$  korrelierte nicht mit der Anzahl der Impfungen vor Transplantation und gesamt.

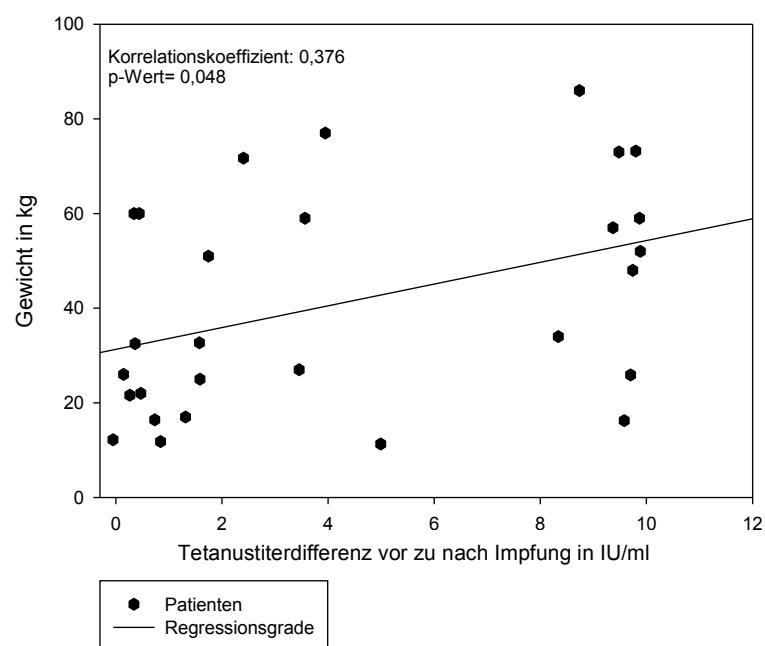




**Abbildung 21: Titeranstiege gegen Tetanustoxoid als Differenz von vor zu nach Impfung ( $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$ ) (n = 28)**

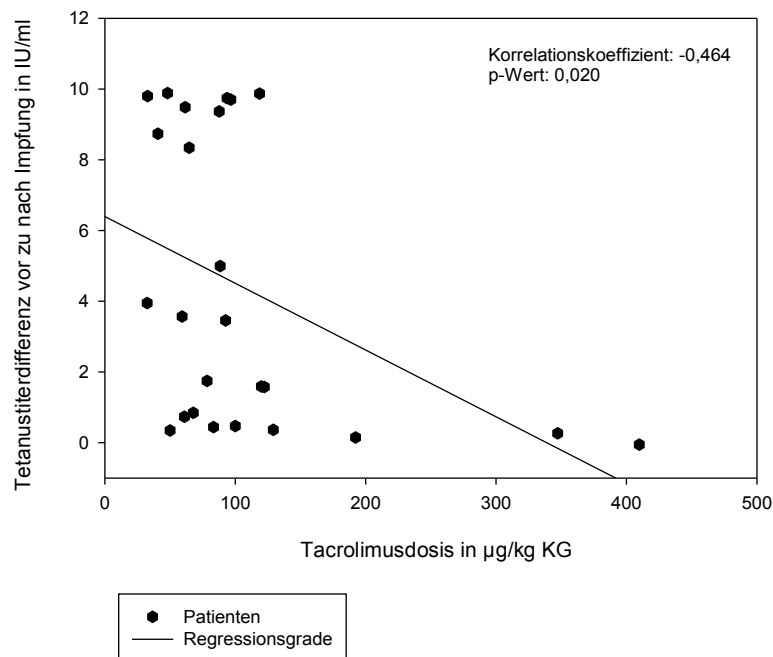
Der Median der  $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$  lag bei 2,93 (-0,06-9,89) IU/ml. Es lag keine Abhängigkeit der  $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$  von Geschlecht, Alter bei Studieneinschluss, Alter bei Transplantation, Art der Transplantation, Art der Impfung, Zeit seit letzter Impfung, Einschränkung der Nierenfunktion, Steroideinnahmen, Erhalt von Immunglobulinen, Zeit seit Transplantation, und der MMF-Dosis vor.  $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$  korrelierte nicht mit der Anzahl der Impfungen vor Transplantation und gesamt.

Das Gewicht korrelierte signifikant positiv mit der  $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$  (KK: 0,376, p-Wert: 0,048) (siehe Abb. 22).



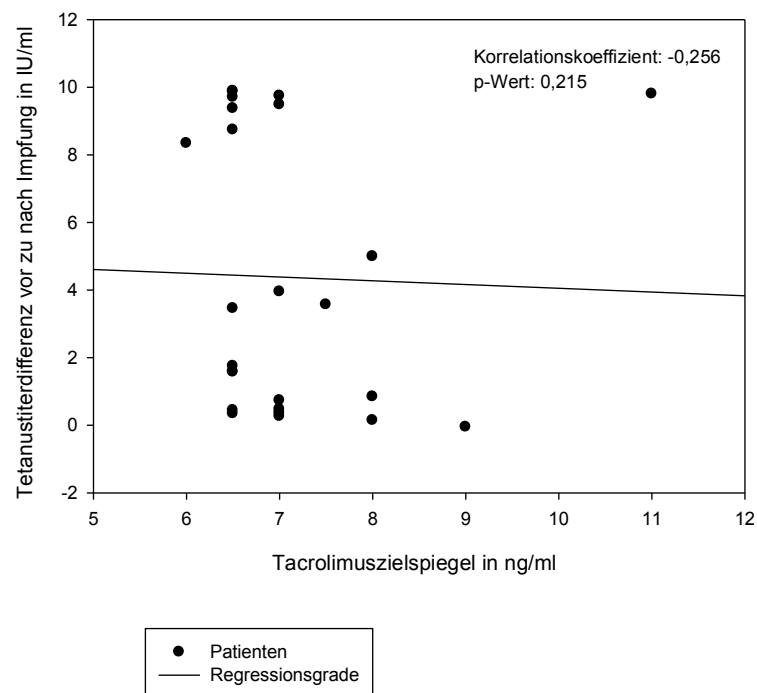
**Abbildung 22: Korrelation des Gewichtes der Patienten mit der  $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$**

Die Höhe der verabreichten Dosen an Tacrolimus korrelierte negativ mit der Höhe der DiffTit<sup>Tet</sup> (KK: -0,464, p-Wert: 0,020) (siehe Abb. 23).



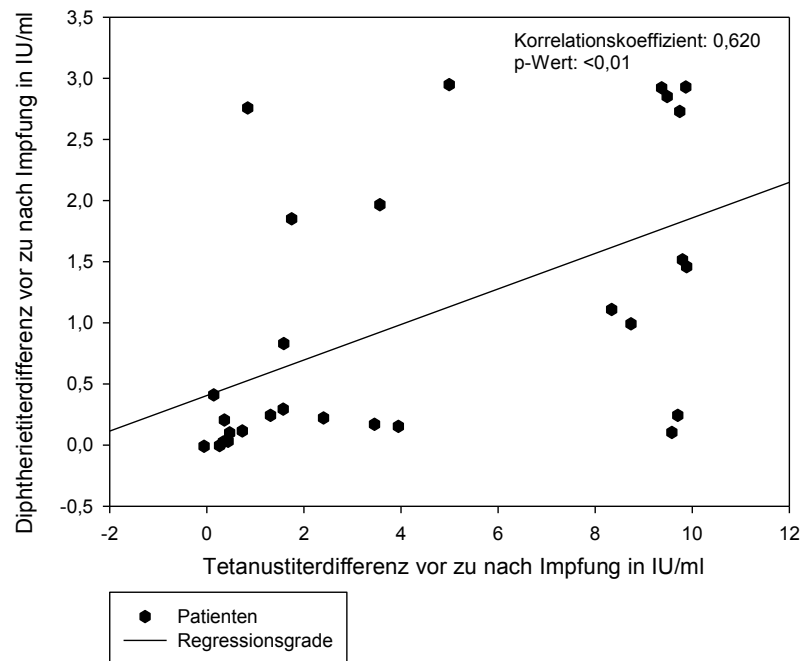
**Abbildung 23: Korrelation Tacrolimusdosis mit der DiffTit<sup>Tet</sup>**

Die Höhe der angestrebten Talspiegel für Tacrolimus korrelierte nicht mit der Höhe der DiffTit<sup>Tet</sup> (KK: -0,256, p-Wert: 0,215) (siehe Abb. 24).



**Abbildung 24: Korrelation des Titeranstieges in Form der Differenz vor zu nach Impfung gegen Tetanustoxoid mit dem angestrebten Tacrolimuszielspiegel**

Es lag eine signifikant positive Korrelation von  $\text{DiffTit}^{\text{Tet}}$  und  $\text{DiffTit}^{\text{Diph}}$  vor (KK: 0,620, p-Wert  $<0,01$ ) (siehe Abb. 25).



**Abbildung 25: Korrelation der Titeranstiege gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid in Form der Differenz vor zu nach Impfung**

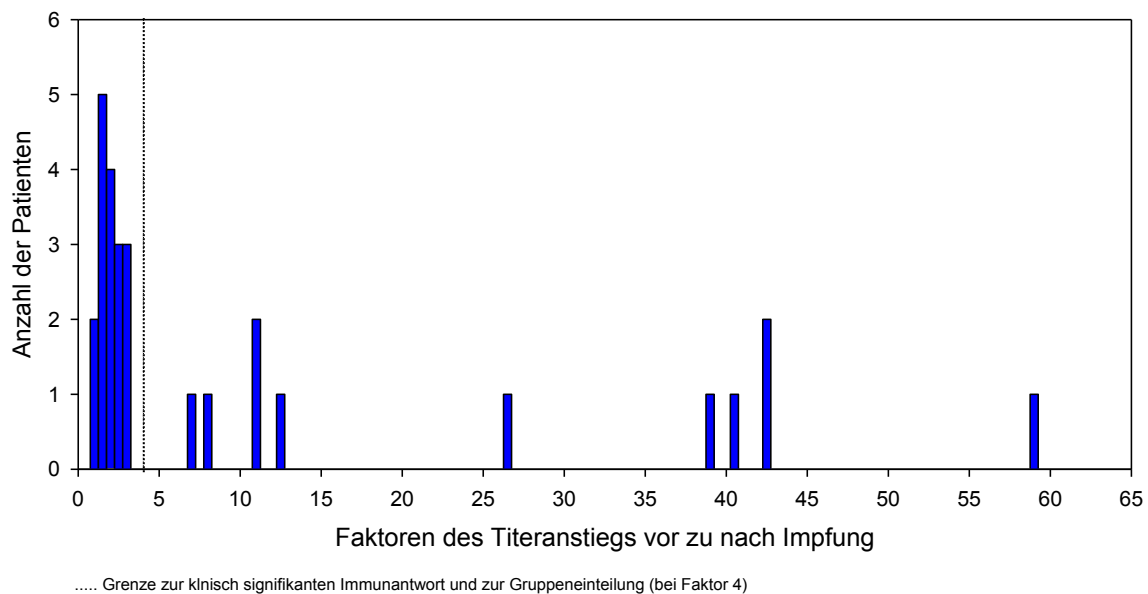
## 3.2.1.3. Auswertung der humoralen Immunantwort über Faktoren

Die Anstiege der Titer in Form von Faktoren der Antikörperkonzentrationen gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid vor zu nach Impfung ( $\text{FaktTit}^{\text{Tet}}$  und  $\text{FaktTit}^{\text{Diph}}$ ) wurden wie folgt errechnet:

$$\text{FaktTit} = \text{TitN}/\text{TitV}$$

FaktTit = Faktor des Titeranstieges vor zu nach Impfung

In der Auswertung der FaktTit wurde die Grenze zur klinisch signifikanten Immunantwort entsprechend der überwiegend in der Literatur verwendeten Grenze auf einen 4-fachen Anstieg festgelegt (siehe Kapitel 4.2.1.3). 61 % der Patienten ( $n = 17$ ) hatten einen weniger als vierfachen Titeranstieg für IgG gegen Diphtherietoxoid von vor zu nach Impfung ( $\text{FaktTit}^{\text{Diph}}$ ). 39 % der Patienten ( $n = 11$ ) zeigten einen mehr als 4-fachen Anstieg der Titer gegen Diphtherie auf die Impfung.



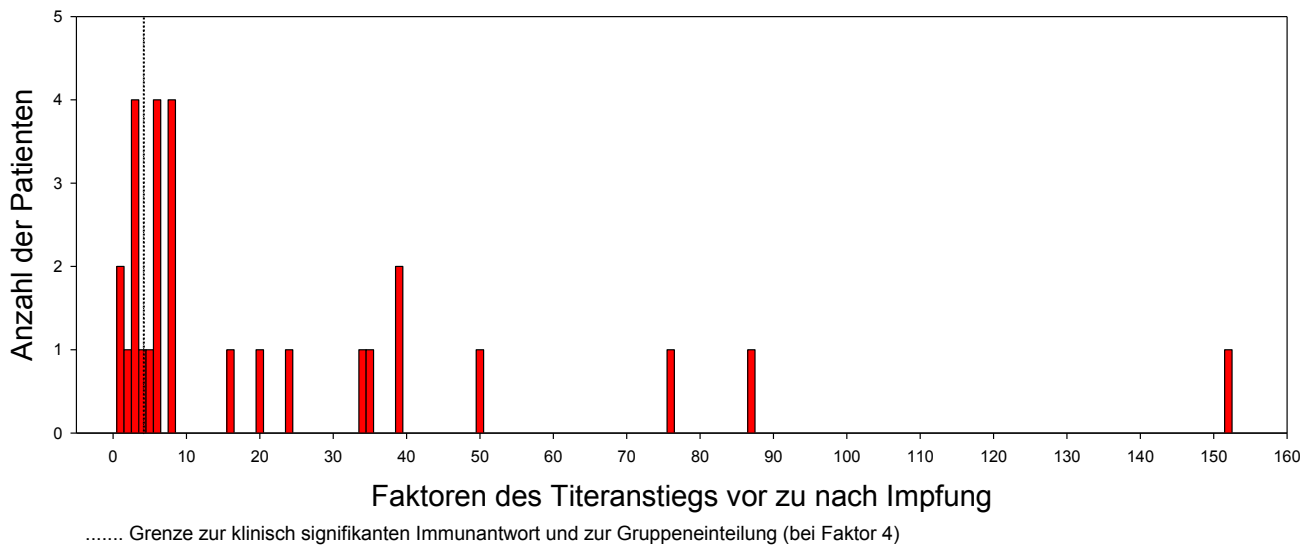
**Abbildung 26: Histogramm zu den Faktoren der Diphtherietiter vor zu nach Impfung ( $\text{FaktTit}^{\text{Diph}}$ )**

Der mediane  $\text{FaktTit}^{\text{Diph}}$  lag bei 2,8 (0,85-58,82). Die Gruppen der  $\text{FaktTit}^{\text{Diph}}$  unterschieden sich nicht hinsichtlich Geschlecht, Alter bei Studieneinschluss, Gewicht, Art der Impfung, Zeit seit letzter Impfung, Zeit seit Transplantation, Art der Transplantation, Erhalt von Immunglobulinen, Einschränkung der Nierenfunktion, Steroideinnahmen und Alter bei Transplantation. Weiterhin bestand kein Unterschied hinsichtlich der FK-Zielspiegel und der MMF-Dosis. Die Höhe der FK-Dosis war jedoch signifikant unterschiedlich in den Gruppen der  $\text{FaktTit}^{\text{Diph}}$  (p-Wert: 0,035). Eine

Korrelation der FK-Dosis mit den FaktTit<sup>Diph</sup> zeigte nur eine Tendenz zur negativen Korrelation (KK: -0,358, p-Wert: 0,078).

FaktTit<sup>Diph</sup> korrelierte nicht mit der Anzahl der Impfungen vor Transplantation und gesamt.

Gegen Tetanustoxoid hatten 25 % (n = 7) einen weniger als 4-fachen Titeranstieg für IgG von vor zu nach Impfung (FaktTit<sup>Tet</sup>).



**Abbildung 27: Histogramm zu den Faktoren des Titeranstiegs gegen Tetanustoxoid vor zu nach Impfung (FaktTit<sup>Tet</sup>)**

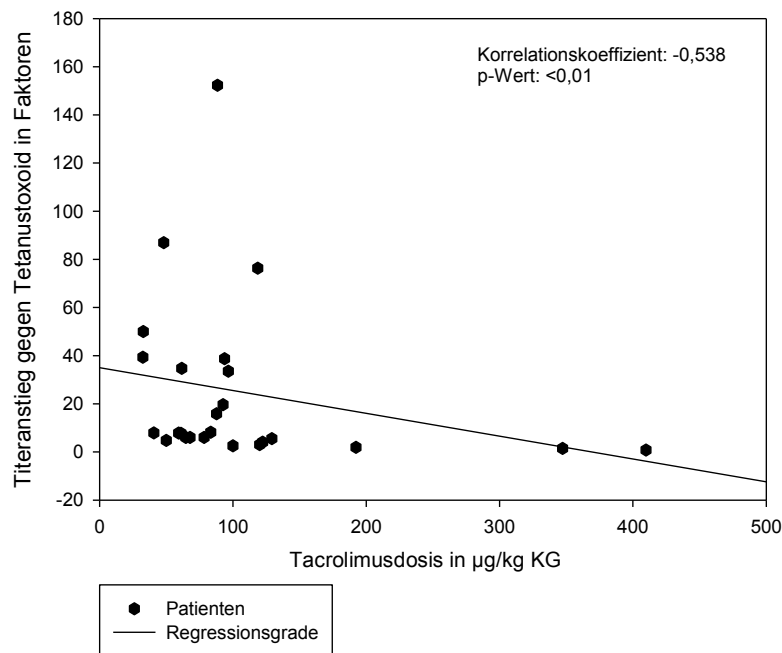
Der Median der FaktTit<sup>Tet</sup> lag bei 7,8 (0,82-152,3). Die Gruppen der FaktTit<sup>Tet</sup> unterschieden sich nicht hinsichtlich Geschlecht, Alter bei Studieneinschluss, Gewicht, Alter bei Transplantation, Art der Transplantation, Art der Impfung, Zeit seit letzter Impfung, Einschränkung der Nierenfunktion, Steroideinnahmen, Erhalt von Immunglobulinen, Zeit seit Transplantation, FK-Zielspiegel und der MMF-Dosis. Die Höhe der Tacrolimusdosis war in den Gruppen der FaktTit<sup>Tet</sup> jedoch signifikant unterschiedlich (siehe Tab. 16).

**Tabelle 16: Vergleich der Gruppen der FaktTit<sup>Tet</sup> hinsichtlich der Höhe der Tacrolimusdosen (n = 28)**

Quotient	n	Fehlend	Median	25 %	75 %
<4	7	2	192,308	115,000	362,876
≥4	21	1	73,114	54,661	93,171
n	28		p-Wert: <0,01 (signifikant)		

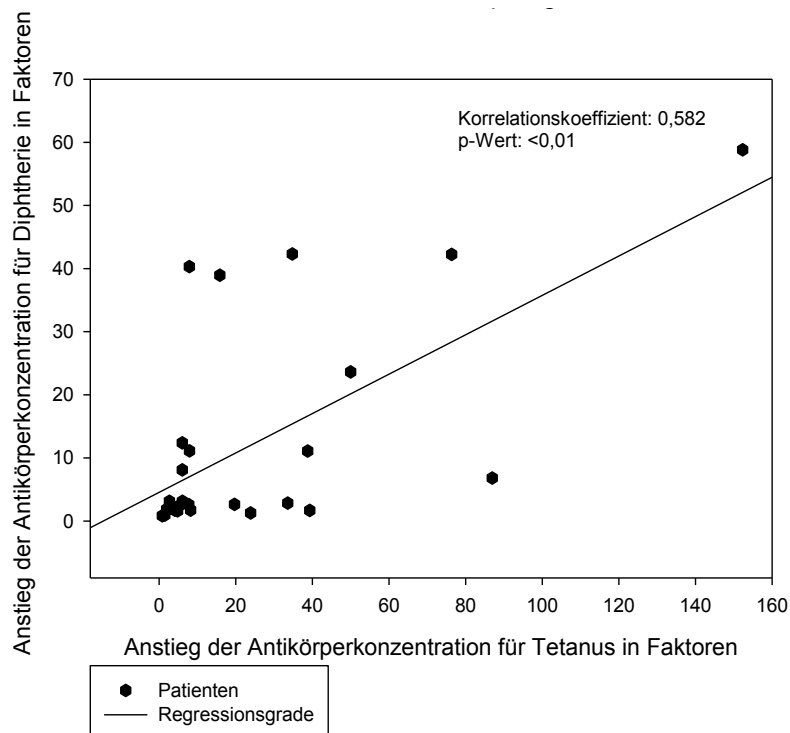
ausgewertet mittels Mann-Whitney-U-Test

In der Korrelation der Tacrolimusdosis mit den FaktTit<sup>Tet</sup> zeigte sich eine signifikant negative Korrelation (KK: -0,538, p-Wert: <0,01) (siehe Abb. 28).



**Abbildung 28: Korrelation der Tacrolimusdosen mit den FaktTit<sup>Tet</sup>**

FaktTit<sup>Tet</sup> und FaktTit<sup>Diph</sup> korrelierten signifikant positiv (KK: 0,582, p-Wert: <0,01) (siehe Abb. 29).



**Abbildung 29: Korrelation der humoralen Antwort gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid in Form von Faktoren von vor zu nach Impfung**

FaktTit<sup>Tet</sup> korrelierten nicht mit der Anzahl der Impfungen vor Transplantation und gesamt.

**Tabelle 17: Immunantwort der Patienten auf die Auffrischimpfung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid**

Antigen	Immunantwort auf Impfung nach 1 Monat		Anteil der Patienten
Diphtherietoxoid	Titer	$\geq 0,1$ IU/ml	86 %
	Titeranstieg	$\geq 4$ -fach	39 %
Tetanustoxoid	Titer nach Impfung	$\geq 1,0$ IU/ml	71 %
	Grenzwert in der Literatur	$\geq 0,1$ IU/ml	100 %
	Titeranstieg	$\geq 4$ -fach	75 %

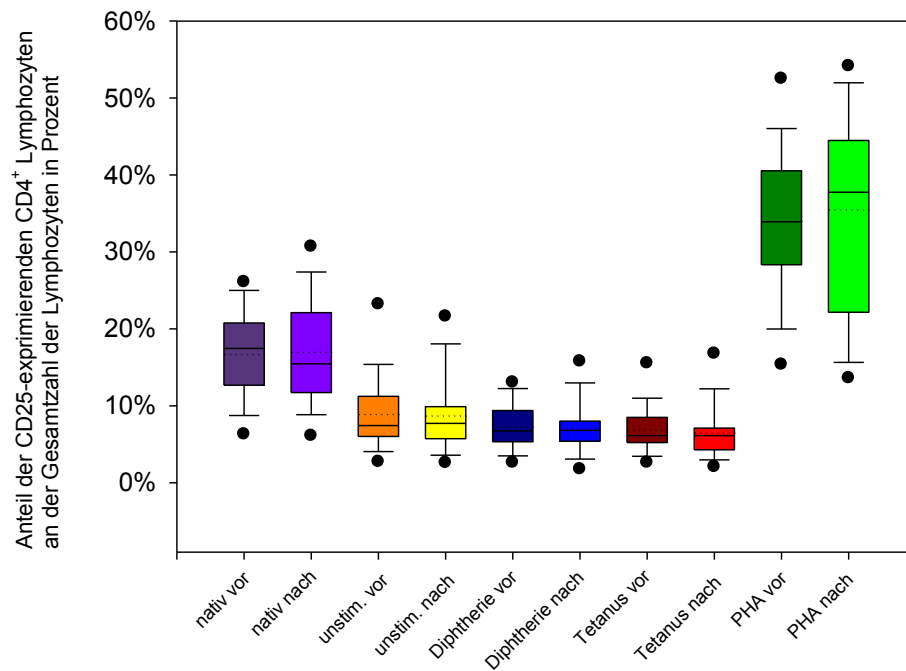
#### 3.2.1.4. Impfversager

Im Fall von 4 Patienten kann von einem Ausbleiben der humoralen Antwort gesprochen werden. Die Patienten S05, S12, S26 und S31 haben auf Diphtherie- und Tetanustoxoid nicht adäquat angesprochen und keinen ausreichenden Titer erreicht. Patienten S03, S23, S24 und S34 haben auf Tetanustoxoid nicht adäquat angesprochen und keinen ausreichenden Titer erreicht.

### 3.2.2. *Immunantwort der T-Zellen auf Impfung*

#### 3.2.2.1. Auswertung des Anteils der exprimierenden Zellen

Die Auswertung des Anteils der exprimierenden Zellen ergab folgende Ergebnisse: Ein signifikanter Anstieg des Anteils der Aktivierungsmarker-exprimierenden T-Lymphozyten bei spezifischer Stimulation ließ sich in der FACS-Analyse weder für CD4<sup>+</sup>, noch für CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nachweisen. Bei den CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zeigte sich keine Zunahme der CD25-exprimierenden Zellen in den unstimulierten, spezifisch und unspezifisch stimulierten Kulturen im Vergleich vor zu nach der Impfung (siehe Abb. 30 und Tab. 18).



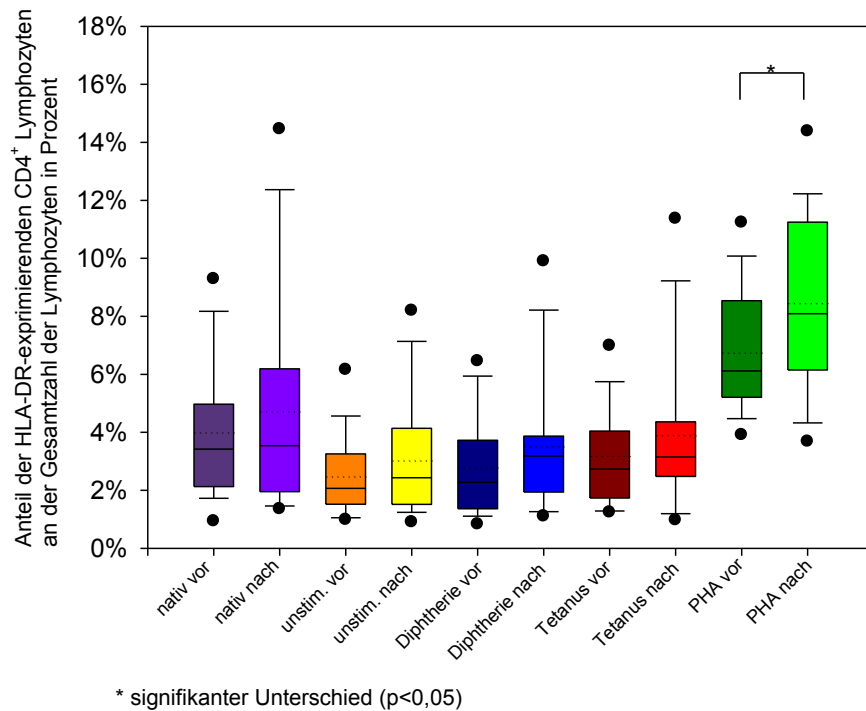
**Abbildung 30:** Anteil der CD25-exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung

**Tabelle 18:** Anteil der CD25-exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid (n = 28)

CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten	Median	Median	
Vergleich vor Impfung/nach Impfung	vor Impf.	nach Impf.	p-Wert
Nativ	17,5 %	15,5 %	0,699 (n.s.)
Unstimuliert	7,4 %	7,7 %	0,955 (n.s.)
Stimulation mit Diphtherietoxoid	6,7 %	6,8 %	0,864 (n.s.)
Stimulation mit Tetanustoxoid	6,1 %	6,1 %	0,260 (n.s.)
Stimulation mit PHA	33,9 %	37,8 %	0,260 (n.s.)
n = 28			
ausgewertet mittels Wilcoxon-Test			

Hinsichtlich der HLA-DR-Expression zeigte sich keine signifikante Zunahme in den unstimulierten und spezifisch stimulierten Kulturen im Vergleich vor zu nach der Impfung. Bei der unspezifischen Stimulation der CD4-positiven T-Lymphozyten zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme HLA-DR-positiver CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (p-Wert: <0,01), im Trend auch bei antigenspezifischer Stimulation mit Diphtherietoxoid (siehe Abb. 31 und Tab. 19).



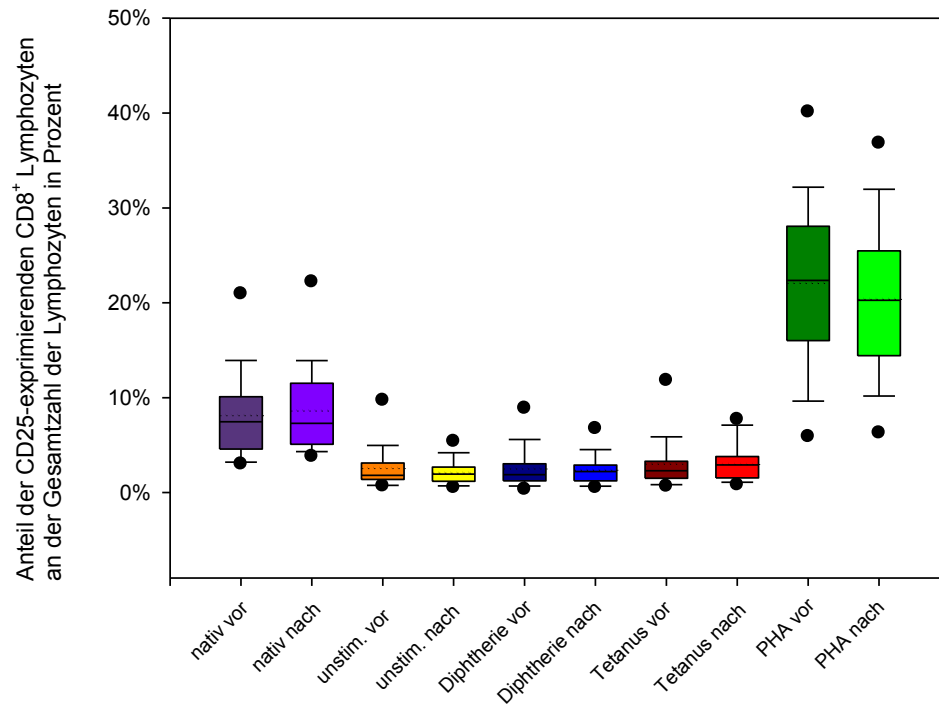


**Abbildung 31: Anteil der HLA-DR-exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung**

**Tabelle 19: Anteil der HLA-DR-exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid (n = 28)**

HLA-DR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten	Median	Median	
Vergleich vor Impfung/nach Impfung	vor Impf.	nach Impf.	p-Wert
Nativ	3,4 %	3,5 %	0,746 (n.s.)
Unstimuliert	2,1 %	2,4 %	0,156 (n.s.)
Stimulation mit Diphtherietoxoid	2,3 %	3,2 %	0,063 (n.s.)
Stimulation mit Tetanustoxoid	2,7 %	3,2 %	0,206 (n.s.)
Stimulation mit PHA	6,1 %	8,1 %	<0,01 (s.)
n = 28			
ausgewertet mittels Wilcoxon-Test			

Bei den CD8<sup>+</sup> Lymphozyten zeigte sich keine Zunahme der Aktivitätsmarker-exprimierenden Zellen in den unstimulierten, spezifisch und unspezifisch stimulierten Kulturen im Vergleich vor zu nach der Impfung hinsichtlich der CD25-Expression (siehe Abb. 32 und Tab. 20).



**Abbildung 32:** Anteil der CD25-exprimierenden CD8<sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung

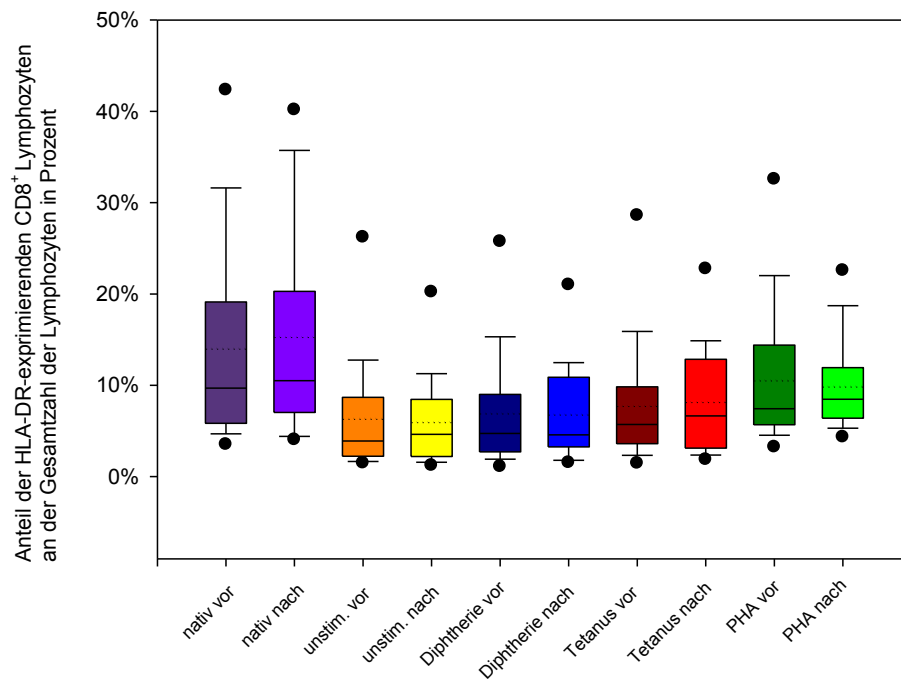
**Tabelle 20:** Anteil der CD25-exprimierenden CD8<sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid (n = 28)

CD25 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten	Median	Median	
Vergleich vor Impfung/nach Impfung	vor Impf.	nach Impf.	p-Wert
Nativ	7,5 %	7,3 %	0,172 (n.s.)
Unstimuliert	1,8 %	2,0 %	0,387 (n.s.)
Stimulation mit Diphtherietoxoid	1,9 %	2,2 %	0,657 (n.s.)
Stimulation mit Tetanustoxoid	2,3 %	2,9 %	0,639 (n.s.)
Stimulation mit PHA	22,4 %	20,3 %	0,269 (n.s.)
n = 28			
ausgewertet mittels Wilcoxon-Test			

Bei den CD8<sup>+</sup> Lymphozyten zeigte sich keine Zunahme der Aktivitätsmarker-exprimierenden Zellen in den unstimulierten, spezifisch und unspezifisch stimulierten Kulturen im Vergleich vor zu nach der Impfung hinsichtlich der HLA-DR-Expression (siehe Abb. 33 und Tab. 21).

In der Auswertung der HLA-DR-Expression, zeigte sich auch generell keine Aktivierung durch das unspezifische Stimulans PHA, weder vor noch nach der Impfung. Dies steht im Kontrast zu einer

Aktivierung durch PHA in Form von HLA-DR-Expression in  $CD4^+$  Lymphozyten und in Form von CD25-Expressionen in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Lymphozyten, sowohl vor, als auch nach Impfung.



**Abbildung 33:** Anteil der HLA-DR-exprimierenden  $CD8^+$  Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung

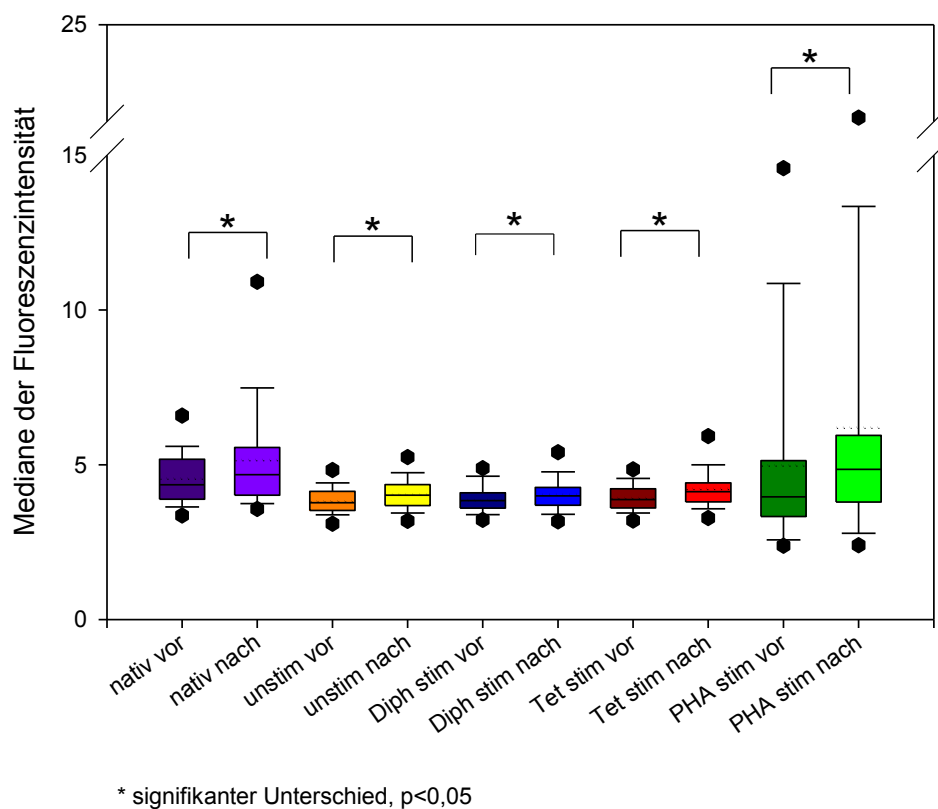
**Tabelle 21:** Anteil der HLA-DR-exprimierenden  $CD8^+$  Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid (n = 28)

HLA-DR <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten	Median	Median	
Vergleich vor Impf/nach Impf	vor Impf.	nach Impf.	p-Wert
unstimuliert unkultiviert	9,7 %	10,5 %	0,057 (n.s.)
unstimuliert kultiviert	3,9 %	4,6 %	0,936 (n.s.)
Stimulation mit Diphtherietoxoid	4,7 %	4,6 %	0,855 (n.s.)
Stimulation mit Tetanustoxoid	5,7 %	6,7 %	0,290 (n.s.)
Stimulation mit PHA	7,4 %	8,5 %	0,741 (n.s.)
n = 28			
ausgewertet mittels Wilcoxon-Test			

## 3.2.2.2. Auswertung der Intensität der Expression über alle T-Lymphozyten

Die Auswertung der Intensität der Expression über alle T-Lymphozyten ergab folgende Ergebnisse: Bei den  $CD4^+$  Lymphozyten zeigte sich ein signifikanter Anstieg der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression bei der Negativkontrolle, der Positivkontrolle und bei spezifischer Stimulation mit Diphtherie- und Tetanustoxoid von vor zu nach Impfung.

Bei den  $CD25$ -exprimierenden  $CD4^+$  Lymphozyten und bei den  $CD8^+$  Lymphozyten zeigte sich keine signifikante Zunahme der kompensierten Fluoreszenzintensität der Expression der Aktivitätsmarker in den unstimulierten, spezifisch und unspezifisch stimulierten Kulturen im Vergleich vor zu nach der Impfung.



**Abbildung 34: Boxplots zu den Medianen der kompensierten Fluoreszenzintensität der Zytochrom-Markierung der HLA-DR-Antigene auf  $CD4^+$  Lymphozyten vor und nach Impfung**

**Tabelle 22: Stärke der kompensierten Fluoreszenzintensität von HLA-DR-FITC auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, Vergleich vor und nach Diphtherie- und Tetanusimpfung (n = 28)**

HLA-DR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten	Median	Median	
Vergleich vor Impf./nach Impf.	vor Impf.	nach Impf.	p-Wert
Nativ	4,35	4,68	<0,01 (s.)
Unstimuliert	3,77	4,02	<0,01 (s.)
Stimulation mit Diphtherietoxoid	3,84	4,00	0,015 (s.)
Stimulation mit Tetanustoxoid	3,88	4,13	<0,01 (s.)
Stimulation mit PHA	3,96	4,85	0,032 (s.)
n = 28			
ausgewertet mittels Wilcoxon-Test			

### 3.2.2.3. Differenzen des Anstieges der medianen Fluoreszenzintensität vor zu nach Impfung

Zur Verdeutlichung des Anstiegs der kompensierten Fluoreszenzintensität und zur Auswertung der Korrelation bzw. der Abhängigkeiten zwischen zellulärer Antwort und anderen Variablen wurden Differenzen des Anstieges der medianen Fluoreszenzintensität von vor zu nach Impfung errechnet. Trotz logarithmischer Aufzeichnung der Mediane der Fluoreszenzintensitäten bei der Auswertung, verhalten sich die Mediane der Fluoreszenzintensitäten selbst nicht logarithmisch. Daher wurden die Differenzen der medianen Fluoreszenzintensität wie folgt berechnet:

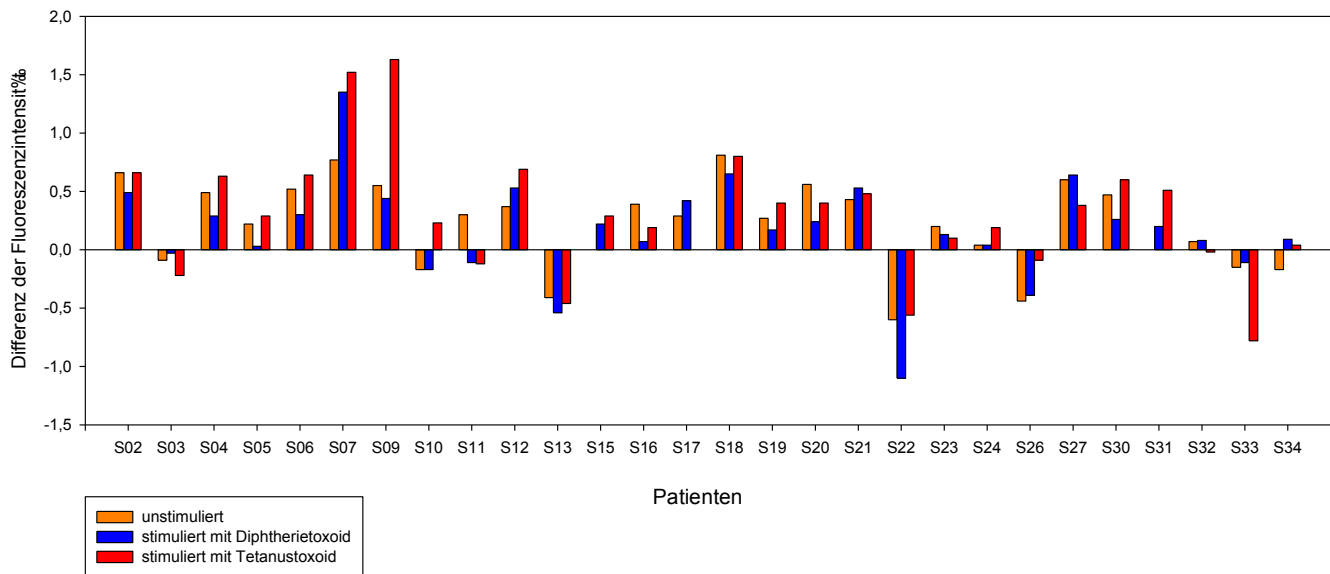
$$\text{DiffFl} = \text{FIN} - \text{FIV}$$

DiffFl4/HLA = Differenz der Fluoreszenzintensitäten vor zu nach Impfung bezüglich der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten

FIN = Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach Impfung

FIV = Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung

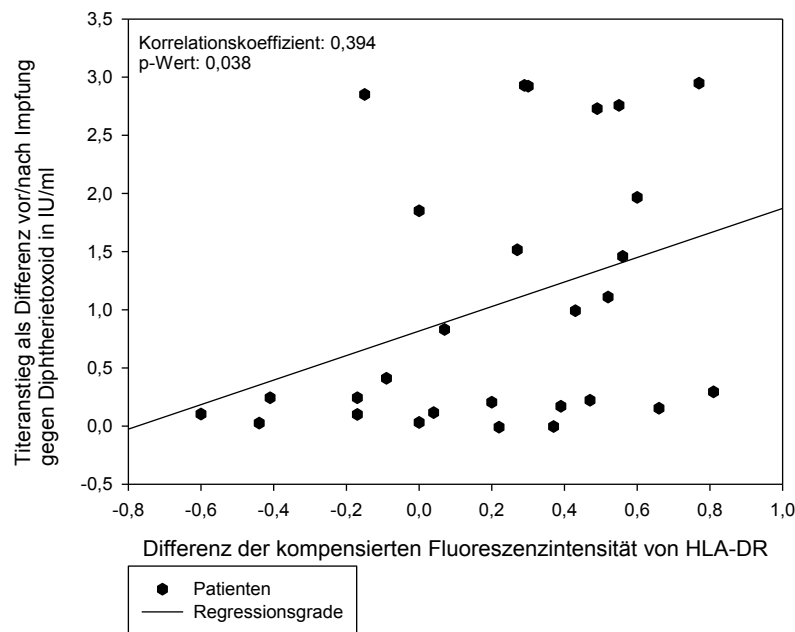
Die Differenzen der Fluoreszenzintensitäten vor zu nach Impfung bezüglich der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ohne Stimulation ( $\text{DiffFl4/HLA}^{\text{unstim}}$ ), nach Stimulation mit Diphtherietoxoid ( $\text{DiffFl4/HLA}^{\text{Diph}}$ ) und nach Stimulation mit Tetanustoxoid ( $\text{DiffFl4/HLA}^{\text{Tet}}$ ) wurden graphisch dargestellt (siehe Abb. 35).



**Abbildung 35: Graphische Darstellung der Differenz der medianen Fluoreszenzintensität, betreffend die HLA-DR-Expression auf unstimulierten und spezifisch stimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor zu nach Impfung**

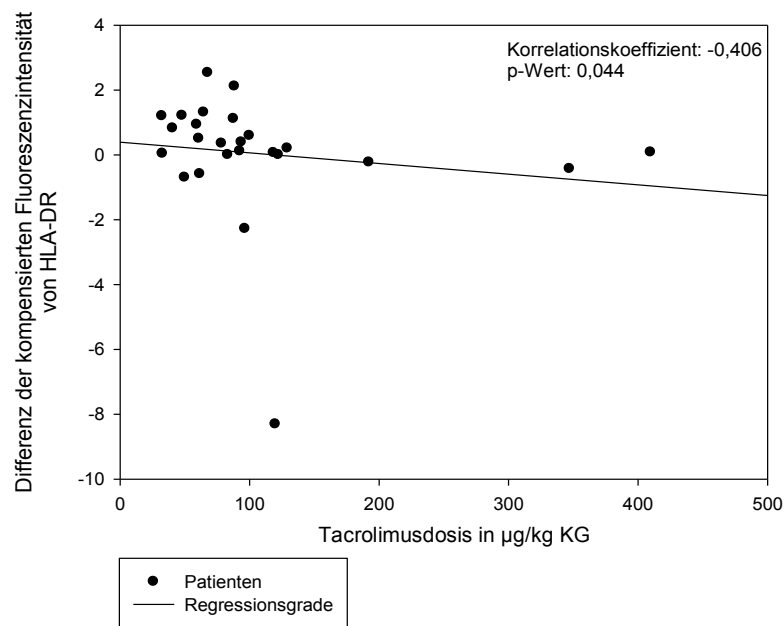
Neben der graphischen Darstellung fand auch ein Vergleich der Differenzen statt. Die Differenzen nach Stimulation mit Diphtherie-, Tetanustoxoid und PHA wurden jeweils mit der Differenz ohne Stimulation verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Zur Auswertung von Abhängigkeiten zu anderen Variablen wurde die  $\text{DiffF14/HLA}^{\text{unstim}}$  mit den anderen Variablen korreliert, bzw. die Gruppen anderer Variabler hinsichtlich  $\text{DiffF14/HLA}^{\text{unstim}}$  verglichen. Es zeigte sich keine Abhängigkeit der zellulären Antwort von Geschlecht, Steroideinnahme, Vorliegen einer kompensierter Niereninsuffizienz, Art der Transplantation und Art der Impfung. Es lag keine Korrelation der zellulären Immunantwort mit dem Alter der Patienten bei Studieneinschluss, dem Alter bei Transplantation, der Zeit seit Transplantation, Zeit seit letzter Impfung, der Grundimmunisierung vor Transplantation, der Tacrolimusdosis, dem Tacrolimuszielspiegel, der MMF-Dosis, der humoralen Antwort in Faktoren und der humoralen Antwort in Differenz auf Tetanustoxoid vor. Die humorale Immunantwort auf Diphtherietoxoid in Form von Differenzen von vor zu nach Impfung korrelierte positiv signifikant mit dem Anstieg der Fluoreszenz hinsichtlich HLA-DR Expression (KK: 0,394, p-Wert: 0,038) (siehe Abb. 36).



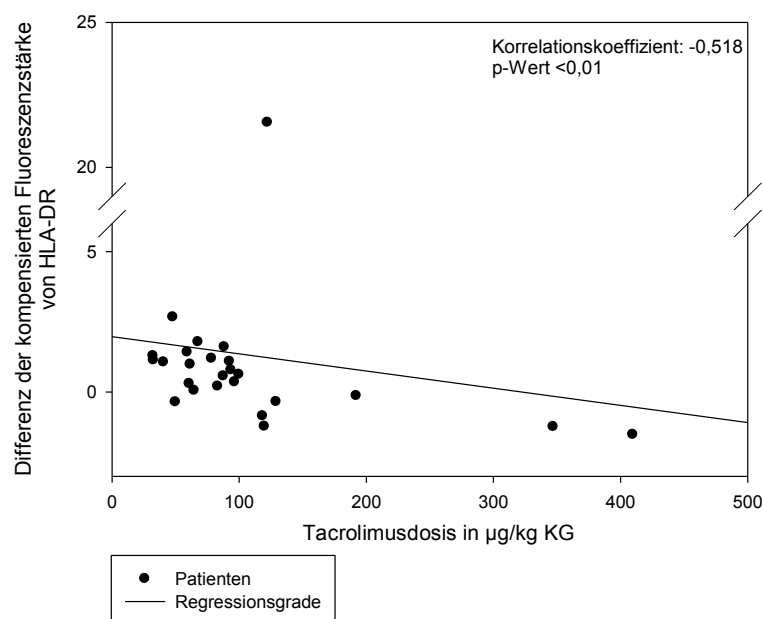
**Abbildung 36: Korrelation der humoralen Immunantwort auf Diphtherietoxoid vor zu nach Impfung in Form von Differenzen mit der zellulären allgemeinen Immunantwort vor zu nach Impfung in Form von Differenzen**

Zur Beurteilung des Einflusses der Tacrolimus-Medikation der Patienten auf die zelluläre Immunantwort wurde eine weitere Auswertung vorgenommen. In Bezug zur Abhängigkeit von den Tacrolimusedosen wurden die Differenzen der Fluoreszenzintensität hinsichtlich HLA-DR- und CD25-Expression nach spezifischer Stimulation mit Diphtherie- und Tetanustoxoid und nach unspezifischer Stimulation mit PHA für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Lymphozyten ausgewertet. Dabei zeigte sich keine Korrelation der Tacrolimusedosis mit der zellulären Immunantwort auf Stimulation mit Diphtherietoxoid und Tetanustoxoid auf  $CD4^+$  Lymphozyten. Die CD25-Expression auf  $CD8^+$  Lymphozyten zeigte keine Abhängigkeit von den Tacrolimusedosen. Die zelluläre Immunantwort der  $CD8^+$  Lymphozyten auf Diphtherietoxoid korrelierte signifikant negativ mit der Tacrolimusedosis in Bezug auf Expression von HLA-DR (KK: -0,406, p-Wert: 0,044, siehe Abb. 37). In der Stimulation mit Tetanustoxoid war nur eine Tendenz zur Abhängigkeit sichtbar (KK: -0,371, p-Wert: 0,067).



**Abbildung 37: Korrelation der zellulären Immunantwort auf Diphtherietoxoid hinsichtlich der HLA-DR-Expression auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten mit der Tacrolimusdosis**

Es zeigte sich keine Korrelation der Aktivierungsmarker auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten mit den Tacrolimusdosen. Bezüglich CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zeigte sich jedoch eine signifikant negative Korrelation der Tacrolimusdosen mit dem Fluoreszenzintensitätsanstieg in Form der HLA-DR-Expression (KK: -0,518, p-Wert: <0,01) (siehe Abb. 38).



**Abbildung 38: Korrelation Fluoreszenzintensitätsanstieg in Form von HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach PHA-Stimulation mit der Tacrolimusdosis**



### 3.2.2.4. Differenzen der Werte der PHA-Stimulierung der CD25-Expression abzüglich der Werte der Negativkontrolle

Zur Evaluierung der Einflüsse der Immunsuppressiva auf den Anstieg der HLA-DR- und CD25-Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten wurden Differenzen der Werte der PHA-Stimulierung abzüglich der Werte der Negativkontrolle vor und nach der Impfung errechnet.

Diese errechneten sich wie folgt:

$$\Delta 4/\text{HLA}^{\text{PHA-V}} = \text{FI4}/\text{HLA}^{\text{PHA-V}} - \text{FI4}/\text{HLA}^{\text{unstimV}}$$

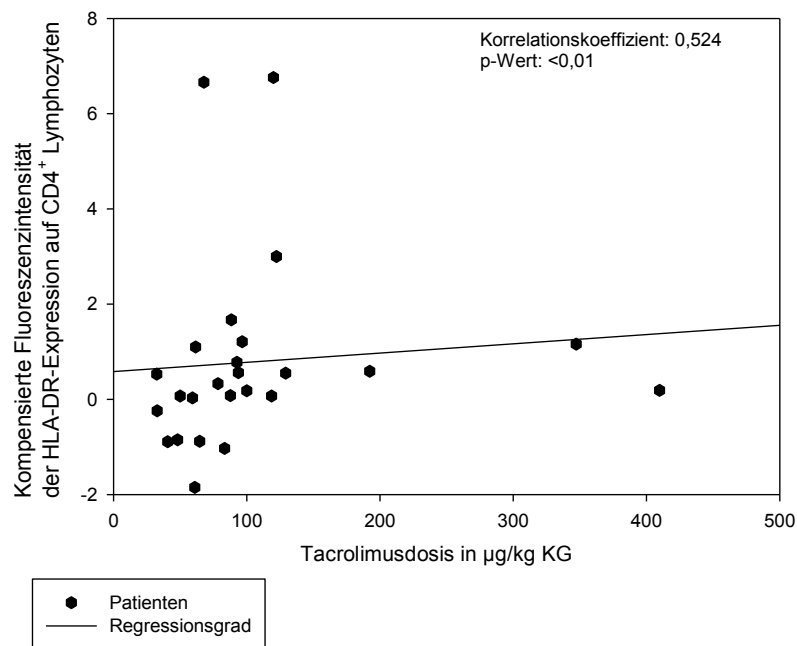
$$\text{Bzw.: } \Delta 4/25^{\text{PHA-V}} = \text{FI4}/25^{\text{PHA-V}} - \text{FI4}/25^{\text{unstimV}}$$

$\Delta 4/\text{HLA}^{\text{PHA-V}}$  = Differenz der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA abzüglich der Negativkontrolle.

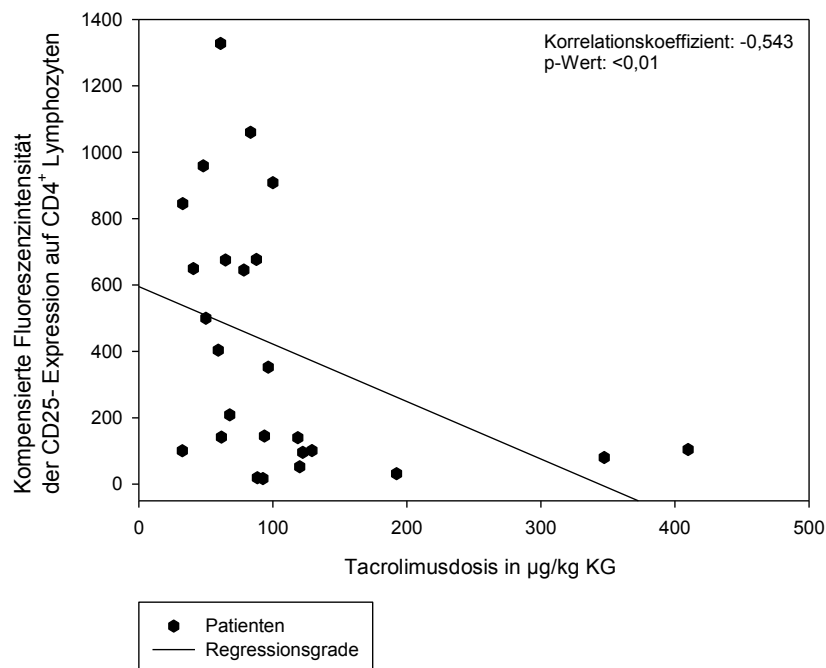
$\text{FI4}/\text{HLA}^{\text{PHA-V}}$  = Mediane kompensierte Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA.

$\text{FI4}/\text{HLA}^{\text{unstimV}}$  = kompensierte Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf unstimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung.

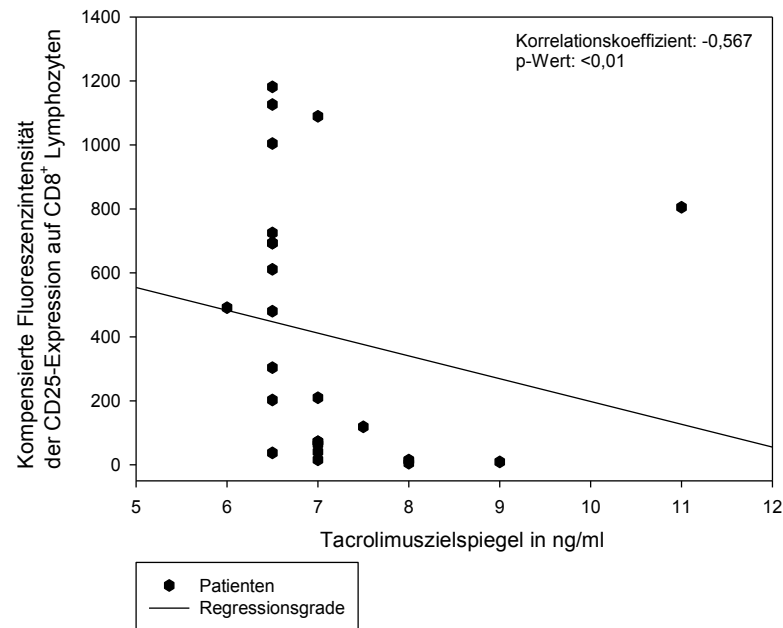
Diese Differenzen zur PHA-Stimulation vor Impfung wurden mit der Tacrolimusdosis, den Tacrolimuszielspiegeln, der MMF-Dosis korreliert und die Gruppen ohne und mit Steroideinnahme verglichen. Es zeigte sich keine Korrelation der Differenzen mit den Tacrolimuszielspiegeln, der MMF-Dosis und kein Unterschied der Gruppen ohne und mit Steroideinnahme. Jedoch korrelierte vor der Impfung die HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten signifikant positiv mit der Tacrolimusdosis (siehe Abb. 39) und die CD25-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten korrelierte signifikant negativ mit der Tacrolimusdosis (siehe Abb. 40). Desweiteren zeigte sich eine negative Korrelation der CD25-Expression auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten mit den Tacrolimuszielspiegeln (siehe Abb. 41).



**Abbildung 39: Korrelation der Tacrolimusdosis mit Differenz der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA abzüglich der Negativkontrolle.**



**Abbildung 40: Korrelation der Tacrolimusdosis mit Differenz der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der CD25-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA abzüglich der Negativkontrolle.**



**Abbildung 41: Korrelation der Tacrolimuszielspiegel mit Differenz der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der CD25-Expression auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA abzüglich der Negativkontrolle.**

### 3.2.3. *Verträglichkeit der Impfung*

Das Spektrum an unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist in Tabelle 23 dargestellt. Klinische Hinweise auf eine Transplantatabstoßung traten im Rahmen dieser Studie nicht auf.

**Tabelle 23: Impfnebenwirkungen**

Symptome	Anzahl der Sympt. (in %) n = 59	Prozent der Patienten, n = 24
<b>Lokal</b>		
<b>Schmerz an Injektionsstelle</b>		
Insgesamt:	18 (31 %)	75 %
Schwer:	1 (2 %)	4 %
<b>Muskelschmerz</b>		
Insgesamt:	9 (15 %)	38 %
Schwer:	0	0 %
<b>Schwellung (&gt;5mm)</b>		
Insgesamt:	2 (3 %)	8 %
Schwer: (>50mm)	1 (2 %)	4 %
<b>Erythem (&gt;5mm)</b>		
Insgesamt:	1 (2 %)	4 %
Schwer: (>50mm)	0	0 %

<b><u>Systemisch</u></b>		
<b>Unwohlsein</b>		
Insgesamt:	8 (14 %)	33 %
Schwer:	1 (2 %)	4 %
<b>Einschränkung der Belastbarkeit</b>		
Insgesamt:	7 (12 %)	29 %
Schwer:	0	0 %
<b>Kopfschmerz</b>		
Insgesamt:	5 (8 %)	21 %
Schwer:	2 (3 %)	8 %
<b>Fieber</b>		
Insgesamt:	3 (5 %)	13 %
Schwer:	0	0 %
<b>Exanthem</b>		
Insgesamt:	1 (2 %)	4 %
Schwer:	0	0 %
<b>Unruhiger Schlaf</b>		
Insgesamt:	1 (2 %)	4 %
Schwer:	0	0 %
<b><u>Kardial:</u></b>		
<b>Beschleunigte Atmung</b>		
Insgesamt:	2 (3 %)	8 %
Schwer:	0	0 %
<b>Leichte Atemnot</b>		
Insgesamt:	1 (2 %)	4 %

Schweregradskala: leicht: Symptom scheint Patient nicht zu stören, mäßig: Symptom beeinträchtigt Verhalten des Patienten, Schwer: Das Symptom schränkt Patient in Alltagsaktivität massiv ein.

Es gab Mehrfachnennungen der Patienten: Von 24 Patienten zeigten 21 Nebenwirkungen auf die Impfung, davon berichteten 8 Patienten von 1 Symptom, 2 Patienten von 2, 5 Patienten von 3, 1 Patient von 4, 3 Patienten von 5, ein Patient von 6 und ein Patient von 8 Symptomen

### 3.2.4. *Weitere einflussnehmende Faktoren*

#### 3.2.4.1. Ort der Impfung

Die Patienten unserer Kohorte wurden in unterschiedlichen Zentren behandelt. Die Impfungen fanden im Klinikum Großhadern und in Kinderarztpraxen statt. 18 Patienten wurden im Klinikum Großhadern geimpft und 10 Patienten auswärts.

Aufgrund der Annahme, dass es Unterschiede im Ablauf der Blutentnahme und des Versands an den verschiedenen Orten gegeben hat, wurde untersucht, ob die Patienten mit unterschiedlichen Impforten einen signifikanten Unterschied in der humoralen Antwort auf Diphtherietoxoid und Tetanustoxoid aufweisen.

Die Auswertung ergab, dass der Ort der Impfung keinen Einfluss auf den humoralen Impferfolg hat; weder auf die humorale Immunantwort in Form von Differenzen, noch auf den Titeranstieg in Faktoren gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid. Der Ort der Impfung hat auch keinen Einfluss auf die unspezifische HLA-DR-Expression auf unstimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

#### 3.2.4.2. Abstand zwischen Blutentnahme und FACS-Analyse

Um zu untersuchen, ob längere Transportwege einen Störfaktor in der Studiendurchführung darstellen, wurden die Patienten hinsichtlich Abstand der 2. Blutentnahme zu Beginn der FACS-Analyse in Gruppen eingeteilt und verglichen. Der Vergleich erfolgte über die DiffFL4/HLA<sup>unstim</sup> und über R<sup>PHA-N</sup>.

Die Auswertung zeigte, dass sich die Gruppen nicht hinsichtlich DiffFL4/HLA<sup>unstim</sup> und R<sup>PHA-N</sup> unterscheiden (p-Werte: Gruppenvergleich hinsichtlich DiffFL4/HLA<sup>unstim</sup>: 0,664, R<sup>PHA-N</sup>: 0,320).

Die Anzahl der Tage zwischen 2. Blutentnahme und FACS-Analyse hatte somit keinen Einfluss auf HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

#### 3.2.4.3. Differenz zwischen Impfung und 2. Blutentnahme

Um zu untersuchen, ob längere Abstände zwischen Impfung und 2. Blutentnahme einen Störfaktor darstellen, wurden die Patienten nach der Differenz zwischen Impfung und 2. Blutentnahme in Tagen in Gruppen eingeteilt.

Diese Gruppen wurden miteinander verglichen, um einen Einfluss der Tagesdifferenz zu untersuchen. Der Vergleich erfolgte anhand DiffTit gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid, FaktTit gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid, anhand DiffFL4/HLA<sup>unstim</sup> und R<sup>PHA-N</sup>. Es zeigten sich für alle Variablen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch eine Korrelation der Tagesdifferenzen mit DiffTit<sup>Diph</sup>, DiffTit<sup>Tet</sup>, FaktTit<sup>Diph</sup>, FaktTit<sup>Tet</sup>, DiffFL4/HLA<sup>unstim</sup> und R<sup>PHA-N</sup> ergab keine signifikante Korrelation. Die Auswertungen zeigten, dass die Anzahl der Tage zwischen Impfung und 2. Blutentnahme keinen Einfluss auf die humorale und die zelluläre Immunantwort hatte.

## 4. Diskussion

### 4.1. Patienten und Methoden

#### 4.1.1. *Patientenzahl*

Zurzeit finden pro Jahr weltweit 400 Herztransplantationen an Kindern statt.<sup>5</sup> Daher ist es schwierig, große Patientenzahlen an herztransplantierten Kindern in Studien einzuschließen. Diese geringen Patientenzahlen müssen bei der Bewertung von Studien zu dieser Patientengruppe und auch bei der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden.

#### 4.1.2. *Medikation*

##### 4.1.2.1. Immunsuppressiva

Im Vergleich zu Veröffentlichungen zu Tetanus- und Diphtherieimpfungen bei transplantierten Kindern gibt es hinsichtlich der immunsuppressiven Therapie einen Unterschied unserer Kohorte zu anderen Studien. In Bezug auf die humorale Antwort auf Diphtherie- und Tetanusimpfungen bei transplantierten Kindern spielen speziell die Arbeiten von Pedrazzi et al., Ghio et al., Enke et al. und Scheifele et al. eine wichtige Rolle.<sup>29,53,54,55</sup> Die Patienten der Kohorten dieser Arbeiten erhielten vorrangig Cyclosporin, Mycophenolat, Steroide und Azathioprin als immunsuppressive Therapie. In unserer Studie hingegen spielt die Medikation mit Tacrolimus eine wichtige Rolle in der immunsuppressiven Therapie. 25/28 Patienten unserer Kohorte werden mit Tacrolimus behandelt. Mehrere Studien zeigen, dass die Tacrolimuszielspiegel im Blut nicht streng mit den Tacrolimudosen korrelieren.<sup>40,41,42</sup> Dies können wir in unserer Studie bestätigen (siehe Abb. 10). Die Dosierung der Patienten mit Tacrolimus ist abhängig von der Zeit seit Transplantation, da zu Beginn die Immunsuppression direkt nach Transplantation besonders intensiv erfolgen muss, um eine akute Abstoßung zu verhindern.<sup>36,40</sup> Es werden daher direkt nach Transplantation hohe Talspiegel angestrebt, die dann schrittweise abgesenkt werden. Dies war auch in unserer Kohorte der Fall und wurde durch die signifikant negative Korrelation der Tacrolimuszielspiegel mit der Zeit seit Transplantation bestätigt (siehe Abb. 11). Desweiteren stellten wir einen Zusammenhang der Tacrolimudosen mit dem Alter der Patienten fest. Je älter die Patienten, desto geringer waren die verabreichten Tacrolimudosen pro kg KG. Dies lässt sich gut mit der Notwendigkeit höherer Dosen aufgrund eines gesteigerten Metabolismus bei jungen Kindern erklären. Shishido et al. zeigten, dass Kleinkinder nach Nierentransplantation erhöhte orale Dosen benötigen, um einen ähnlichen Talspiegel zu erreichen wie ältere Kinder.<sup>56</sup> Auch Kausman et al. bestätigten diesen Zusammenhang.<sup>57</sup> Zurückzuführen ist dies auf

eine erhöhte Aktivität des Enzymes CYP3A4. Dieses setzt Tacrolimus zusammen mit dem Enzym CYP3A5 in Kleinkindern nahezu doppelt so schnell um wie in Erwachsenen.<sup>58</sup>

Die Notwendigkeit eines Monitoring von Mycophenolat Mofetil ist umstritten, starke interindividuelle Unterschiede in der Metabolisation stellen jedoch ein Problem im Monitoring dar. Da MMF eine hohe therapeutische Breite hat, wurde es lange als nicht notwendig erachtet, Medikamentenspiegel im Blut zu bestimmen.<sup>59</sup> Des Weiteren ist das Monitoring aufgrund eines zweigipfligen Verlaufs der Medikamentenlevel schwierig. Das Auftreten des zweiten Gipfels ist zudem interindividuell variabel, was die Talspiegel unzuverlässig macht. Somit ist ein Durchführen von mehreren Spiegelbestimmungen notwendig, um eine verlässliche Aussage über den Medikamentenspiegel zu erhalten.<sup>44</sup> Daher werden meist weiterhin Körpergewicht-abhängige Standarddosen verabreicht, die nicht abhängig von der Zeit seit Transplantation vermindert werden müssen. Jedoch nimmt die notwendige zu verabreichte Menge des MMF mit zunehmendem Alter ab.<sup>58</sup> Dies liegt an einem größeren extrazellulären Volumen, einem erhöhten Gesamtwasseranteil und einem erhöhten Wasser/Liquid Verhältnis in Fettdepots in Kleinkindern. Dadurch ergeben sich geringere Plasmaspiegel in diesen Kompartimenten.<sup>44</sup>

Die Körpergewicht-abhängige MMF-Dosierung wurde auch in unserer Kohorte angewendet und bestätigte sich in den Ergebnissen unserer Auswertung. Es lag eine signifikante Korrelation von MMF-Dosis und Gewicht vor (KK: -0,505, p-Wert: 0,020).

Auch für Tacrolimus zeigte sich eine signifikant negative Korrelation der Tacrolimusdosis mit dem Gewicht (KK: -0,623, p-Wert: <0,01). Des Weiteren zeigte sich eine signifikant negative Korrelation der Tacrolimusdosen mit dem Alter der Patienten. Diese Korrelation ist parallel zu der Korrelation mit dem Alter zu sehen. Alter und Gewicht der Patienten korrelieren signifikant positiv (KK: 0,885, p-Wert: <0,01).

#### 4.1.2.2. Sonstige Medikamente

Die sonstigen Medikamente dienen vorwiegend der Behandlung von Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie oder anderer Risikofaktoren für Transplantatvaskulopathie, Therapie der Hyperlipidämie über Statine, Therapie und Prophylaxe einer Osteoporose über Vitamin D3 und Calcium, Therapie der Hypertonie über ACE-Hemmer, Calcium-Kanal-Blocker, Betablocker und Diuretika, Behandlung der Niereninsuffizienz über Diuretika und Therapie und Prophylaxe von Infekten durch Bakterien, Viren und Pilzen durch Antibiotika und Antimykotika. Weiterhin werden viele Elektrolyte und Spurenelemente ergänzt und sonstige Erkrankungen behandelt.

#### 4.1.3. *Impfstatus*

Der Impfstatus wurde in Form der Anzahl der Tetanusimpfungen vor Transplantation und bei Studieneinschluss ausgewertet. Dies wurde exemplarisch anhand der Tetanusimpfungen ausgewertet. Die Anzahl der Tetanus- und Diphtherieimpfungen entsprechen sich, bis auf eine Tetanusimpfung, die bei einem Patienten zusätzlich verabreicht wurde, die aber keinen Einfluss auf die Einteilung „ausreichend“, „nicht ausreichend“ der Tabellen hat. Die ermittelten Werte für Tetanusimpfungen lassen sich also identisch auf Diphtherieimpfungen übertragen.

Die empfohlenen Zeitpunkte der Auffrischimpfungen waren in den verschiedenen STIKO-Empfehlungen unterschiedlich. Während von 1991 bis 2000 die erste Auffrischimpfung ab dem 6. Lebensjahr empfohlen wurde, wurde ab 2001 dieser Zeitrahmen auf 4-5 Jahre festgelegt. Auch der Termin der zweiten Auffrischimpfung veränderte sich von 11.-15. Lebensjahr (1991-1997) zu 11.-18. Lebensjahr (1998-2000) zu letztendlich 9-17 Jahre (2001-2007). Analog zu Auswertungen des Robert-Koch-Instituts wurden Kinder im Alter von unter 24 Monaten nicht in der Auswertung der Impfprophylaxe berücksichtigt.<sup>52</sup>

Der Impfstatus gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid zum Zeitpunkt der Transplantationen ist unzureichend. Nur 43 % der Kinder waren numerisch ausreichend geimpft. Diana et al. ermittelten identische Werte für lebertransplantierte Kinder, allerdings 1 Jahr nach Transplantation. Sie beobachteten bezüglich Diphtherie und Tetanus 43 % numerisch ausreichend geimpfte Kinder.<sup>60</sup> Damit liegt unsere Durchimpfungsrate wie die von Diana et al. über der von Verma et al. erfassten Durchimpfungsrate von 20-30 % bei immunsupprimierten Kindern nach Organtransplantation.

Im Vergleich zeigt sich jedoch eine erheblich höhere Durchimpfungsrate bei gesunden Kindern. In einem bundesweiten Survey des Robert-Koch-Institutes (RKI) ermittelten Poethko-Müller et al. eine Durchimpfungsrate von 77,6 % hinsichtlich Tetanus und Diphtherie der über 2-jährigen Kinder.<sup>52</sup>

Dass die Kinder unserer Studie, die im Alter von 2-6 Jahren transplantiert wurden, nicht alle ausreichend geimpft sein konnten ist verständlich. Die Transplantationen fanden in einem frühen Lebensalter statt, in dem in vielen Fällen das Impfen durch die schwerwiegenden Erkrankungen vor Transplantation erschwert ist.<sup>23,27</sup> In dieser Gruppe gab es 60 % ausreichend geimpfte Kinder. Dies steht dennoch im Gegensatz zu deutlich höheren Grundimmunisierungsraten in gesunden Kindern bei Einschulung. Auswertungen des RKI, ermittelten, dass Grundimmunisierungen bei 4 bis 7-Jährigen in 97 % gegen Diphtherie und 98 % gegen Tetanus vollständig durchgeführt wurden.<sup>61</sup>

Auffällig ist in unserer Studie jedoch die Gruppe der >6 bis 18-jährigen Patienten, in der nur 33 % numerisch ausreichend gegen Diphtherie und Tetanus geimpft sind. Bei Patienten dieses Alters wurde vor Transplantation möglicherweise der Impfstatus nicht zuverlässig überprüft. Interessanterweise ermittelten auch Poethko-Müller et al. in ihrer Studie zu gesunden Kindern, dass in der Gruppe der 7 bis 10-Jährigen der Anteil der vollständig geimpften Kinder niedrig ist. So haben nur 57,0 % aller Kinder dieser Gruppe die für das sechste bis siebte Lebensjahr empfohlene Auffrischimpfung gegen Tetanus und 56,6 % die Auffrischimpfung gegen Diphtherie erhalten.



Dass in unserer Studie die Anzahl der zum Tx-Zeitpunkt numerisch ausreichend geimpften Kinder im Alter von 2-6 Jahren im Vergleich zum Gesamtdurchschnitt so hoch ist, zeigt, dass in der Vorbereitung auf die Transplantation in dieser Altersgruppe inzwischen mehr Wert auf einen ausreichenden Impfstatus gelegt wird. Dies ist eine erfreuliche Entwicklung, da in vielen Studien festgestellt wurde, dass eine Grundimmunisierung vor Transplantation große Vorteile bezüglich der humoralen Immunantwort auf spätere Auffrischimpfungen mit sich bringt.<sup>20,27</sup> Unsere Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass in Zukunft bei Kindern die bei Transplantation älter als 6 Jahre alt sind vor Transplantation mehr auf die Vollständigkeit der Impfprophylaxe geachtet werden muss.

Es ist zu beobachten, dass in unserer Studie auch bei Studieneinschluss die jüngeren Kinder in Bezug auf die STIKO-Impfempfehlungen numerisch besser geimpft waren als die älteren Kinder. Es ist bekannt, dass Impfungen bei immunsupprimierten Kindern nach Transplantation aus Angst vor Abstoßung und verminderter Antikörperantwort zögerlicher verabreicht werden.<sup>29,54</sup> Aufgrund der hohen Impfrate der jüngeren Kinder scheint die Bedeutung und Wichtigkeit einer guten Impfprophylaxe Einzug in den klinischen Alltag gefunden zu haben und es wird auf eine korrekte Impfprophylaxe mehr Wert gelegt.

Auch in gesunden Kindern, liegt die Impffrequenz in dieser Altersgruppe generell höher, was ein bundesweiter Survey des Robert-Koch-Institutes eindrücklich bestätigt.<sup>52</sup>

Hinsichtlich der Durchführung der Grundimmunisierungen vor Transplantation bei den über 2-jährigen Patienten zeigte sich in unserem Patientenkollektiv (n = 23) ein Anteil der vollständig grundimmunisierten Kinder von 71 % (n = 12). Im Vergleich zu gesunden Kindern, zeigt sich der unzureichende Impfstatus deutlich.

In einem bundesweiten Surveys des Robert-Koch-Institutes, ermittelten Poethko-Müller et al. Grundimmunisierungsraten von gesunden über 2-jährigen Kindern von 98,1 % gegen Tetanus und 97,7 % gegen Diphtherie.

Es zeigt sich zusammenfassend, dass die Impfrate der transplantierten Kinder sowohl vor Transplantation als auch nach Transplantation weit unter den Impfraten gesunder Kinder liegt. Dies ist durch lange Krankenhausaufenthalte aufgrund der schweren Erkrankungen, frühe Transplantationen, Nachlässigkeit in der Kontrolle der Impfpässe vor Transplantation und durch Zögern im Verabreichen von Impfungen zu begründen.<sup>23,29,54</sup>

#### 4.1.3.1. Unerwartete Titeranstiege vor Impfung

In dieser Studie mussten 2 Patienten aufgrund unerklärlicher Titeranstiege vor Impfung aus der Studie ausgeschlossen werden (S25 und S29) (siehe Kapitel 3.1.5.1.)

Es handelt sich dabei um Titeranstiege, die normalerweise durch eine Auffrischimpfung zustande kommen. Es stellt sich die Frage, was für diesen Anstieg der spezifischen Antikörperkonzentration gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid ursächlich sein könnte. Eine Auffrischimpfung zwischen dem Zeitpunkt der Blutentnahmen zur Kohortenrekrutierung und der ersten Blutentnahme im Rahmen der

Studie wurde von den Patienten verneint; ebenso eine Immunglobulingabe. Ein Kontakt mit Diphtherie- oder Tetanus-Toxin kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber in relevanten Dosen unwahrscheinlich, insbesondere da in einem Fall beide Titer deutlich angestiegen waren.

Eine Fehltestung bei der ersten oder 2. Titerbestimmung ist möglich, das Risiko einer solchen sollte aber aufgrund der Erhebung beider Werte in demselben Labor und mit demselben Kit gering sein.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre das Auftreten einer lymphoproliferativen Erkrankung nach Transplantation.<sup>2,3,5</sup> Aufgrund der Suppression der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten sind die Abwehr und der Abbau veränderter körpereigener Zellen vermindert, was das Risiko für Tumore erhöht. In diesem Zusammenhang wurden lymphoproliferative Erkrankungen beobachtet, die in der Gruppe immunsupprimierter Patienten nach Herztransplantation gehäuft auftraten.<sup>62</sup> Der Formenkreis der lymphoproliferativen Erkrankungen wird von der WHO in mehrere Kategorien unterteilt: frühe Defekte, polymorphe Veränderungen, monomorphe Veränderungen, Hodgkin-Lymphome. Für die beiden Patienten unserer Studie kommen nur frühe Defekte in Betracht, weil diese typischerweise polyklonale Veränderungen verursachen, die Titeranstiege gegen Diphtherie- und Tetanustoxoide erklären könnten und vor allem in jüngerem Alter auftreten. Lymphoproliferative Erkrankungen treten gehäuft bei Patienten mit EBV- und CMV-Infektionen auf.<sup>62</sup> Der Patient S29 ist CMV- und EBV-negativ, bei einer partiellen Tonsillektomie in der Folgezeit nach Studie wurden keine Veränderungen festgestellt. Der Patient S25 ist ebenso CMV- und EBV-negativ. Eine Lymphknotenbiopsie nach Lymphknotenschwellung blieb ohne Befund. In Patient S29 und S25 erscheint eine lymphoproliferative Erkrankung somit sehr unwahrscheinlich.

Es findet sich keine befriedigende Erklärung für die unerwarteten Titeranstiege in diesen beiden Patienten.

## 4.2. Ergebnisteil

### 4.2.1. *Humorale Immunantwort auf Impfung*

Die humorale Immunantwort wurde hinsichtlich vier verschiedener Aspekte untersucht:

- 1.) Erreichen protektiver Titer
- 2.) Titeranstiege in Differenzen
- 3.) Titeranstiege in Faktoren
- 4.) Abhängigkeiten der Titeranstiege und Titer vor und nach Impfung

#### 4.2.1.1. Erreichen protektiver Titer

Die Grenze zu protektiven Titern liegt in der vorliegenden Arbeit bei 0,1 IU/ml gegen Diphtherietoxoid und bei 1,0 IU/ml gegen Tetanustoxoid. Diese Grenzen wurden auch als Einschlusskriterium verwendet. Antikörpertiter gegen Tetanustoxoid im Bereich von 0,1 IU/ml bis 1,0 IU/ml bieten nach unserer Einteilung zwar einen gewissen Schutz, es ist jedoch eine Auffrischimpfung indiziert. Diese Grenzen wurden in unserem Labor in Bezug auf Herstellerinformationen, nationalen Empfehlungen und Erfahrungswerten unseres Labors festgelegt.<sup>23</sup> Die Grenzen für protektive Titer wurden in der Literatur unterschiedlich festgelegt. Es gibt verschiedene ELISA-Assay, deren Hersteller verschiedene Empfehlungen zu Grenzwerten protektiver Titern aussprechen. In vielen ELISA-Assay ist es üblich die Grenze der Titer für ausreichenden Schutz hinsichtlich der Antikörperkonzentrationen sowohl gegen Tetanus, als auch gegen Diphtherie auf 0,1 IU/ml festzulegen.<sup>29,53,54,55</sup> Eine andere Einteilung wird bei Huzly et al., mit einem Grenzwert von  $\geq 0,01$  IU/ml gegen Tetanustoxoid und gegen Diphtherietoxoid von  $\geq 0,1$  IU/ml verwendet.<sup>63</sup>

In unserer Studie fiel auf, dass protektive Titer gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid weniger oft erreicht wurden als in anderen Studien zu Diphtherie- und Tetanusimpfungen. Dies gilt insbesondere für die protektive humorale Immunantwort auf Diphtherietoxoid. Bei Pedrazzi et al. und Enke et al., die die Immunantwort nierentransplantierte Kinder untersuchten, erreichten bei Pedrazzi 94 % der Patienten eine ausreichende Immunantwort auf Diphtherietoxoid und bei Enke 95 %. In unserer Studie wurde eine ausreichende Antwort gegen Diphtherietoxoid nur in 86 % der Patienten erreicht. Dies liegt möglicherweise an der Immunsuppression unserer Patienten. Im Gegensatz zu unseren Patienten erhielten die Patienten in den Studien von Pedrazzi et al. und Enke et al. kein Tacrolimus.

Die Patienten unserer Kohorte erreichten bessere Werte als erwachsene nierentransplantierte Patienten der Studie von Huzly et al.. Der prozentuale Teil der Patienten, die protektive Titer erreichen stimmt mit den Werten unserer Kohorte nahezu überein, aber die mittleren Titerwerte vor und nach der Impfung sind in unserer Kohorte höher. Diese liegen in unserer Studie gegen Diphtherietoxoid vor Impfung als Median bei 0,11 IU/ml (0,07-0,25) und nach der Impfung bei 0,79 IU/ml (0,31-2,37). Gegen Tetanustoxoid ergaben sich vor der Impfung der Median 0,29 IU/ml (0,12-0,53) und nach der

Impfung der Median 3,74 IU/ml (0,83-10,0). Im Vergleich unserer Ergebnisse mit Werten aus der Literatur gilt es zu berücksichtigen, dass Pedrazzi et al., Ghio et al., Scheifele et al., Huzly et al. Mittelwerte zur Auswertung der Titer verwendeten. Dies ist in unserer Studie wegen einer fehlenden Normalverteilung aufgrund der Gruppengröße nicht sinnvoll. Ob die Gruppengrößen anderer Veröffentlichungen ( $n = 35$  Pedrazzi et al.,  $n = 9-57$  Ghio et al.,  $n = 42$  Enke et al.) eine Normalverteilung aufweisen und damit eine Auswertung mittels Mittelwerten sinnvoll ist geht aus den Daten nicht hervor. Pedrazzi et al. ermittelten Mittelwerte von Titern nach der Impfung von 15,7 ( $\pm 7,0$ ) IU/ml gegen Tetanustoxoid und von 5,5 ( $\pm 6,4$ ) IU/ml gegen Diphtherietoxoid. Diese Titer sind in unserer Studie aufgrund der Grenzen des ELISA-Assay nicht erreichbar. Daher ist eine numerische Vergleichbarkeit der Daten nicht möglich. So beschränkt sich die Auswertung auf einen Vergleich der Ergebnisse hinsichtlich der Signifikanzen. Wie in den oben zitierten Studien, werden auch in unserer Studie signifikante Unterschiede der Mittelwerte vor/nach Impfung ermittelt.

#### 4.2.1.2. Titeranstiege in Differenzen

Diese Art der Auswertung findet sich in der Arbeit von Pedrazzi, deren Grenzwerte zur Einteilung einer positiven Titererhöhung bei der Festlegung unserer Grenzen berücksichtigt wurden. Pedrazzi et al. ziehen als Grenzen zur humoralen Immunantwort für Diphtherie 1 IU/ml. Eine normale Immunantwort ergibt sich folglich bei einem Anstieg des Titers gegen Diphtherietoxoid bei  $\geq 1$  IU/ml, und  $< 1$  IU/ml liegt eine schwache Immunantwort vor. Die Grenze zur humoralen Immunantwort gegen Tetanustoxoid liegt bei 5 IU/ml. Da diese Einteilung nicht begründet wird und sich in der Literatur nicht wiederfindet, wurde der Titeranstieg nicht mittels Gruppen ausgewertet.

Im Gegensatz zu Dengler et al., die in einer Studie Impfungen mit Influenza und Pertussis bei herztransplantierten Kindern untersuchten, konnten wir eine Korrelation des Gewichts mit der humoralen Immunantwort auf Tetanustoxoid beobachten.<sup>9</sup> Diese Korrelation kann mehrere Gründe haben. Da wir eine Korrelation des Gewichts mit den Tacrolimusdosen beobachtet haben (siehe Kapitel 4.1.2.1.), könnte eine Erklärung lauten, dass Patienten mit höherem Gewicht geringere Dosen von Tacrolimus erhalten, was mit einer höheren humoralen Immunantwort einhergeht.

Ein weiterer Aspekt könnte der Allgemeinzustand der Patienten sein. Es könnte aufgrund des höheren Gewichts ein besserer Allgemeinzustand der Kinder vorliegen, der mit einem besseren Immunsystem einhergeht. Dogan et al. berichten von einem erhöhten Auftreten von Malnutrition in chronisch kranken Kindern.<sup>64,65</sup> Malnutrition führt zu Einschränkungen des Immunsystems, hinsichtlich der humoralen und zellulären Immunantwort.<sup>66</sup> Unter Anwendung der Perzentilen von Kromeyer-Hauschild et al. wurde das Gewicht unserer Patienten ( $n = 28$ ) im Vergleich zum Gewicht von gesunden Kindern ausgewertet.<sup>48</sup> In unserer Studie zeigt sich, dass sich 50 % der Patienten ( $n = 14$ ) unter der 10ten Perzentile und davon 50 % ( $n = 7$ ) unter der 3ten Perzentile befinden. Damit zeigt einen deutlicher Unterschied zu gesunden Kindern. Aufgrund der Tatsache, dass wir keine Daten zur Größe der Kinder haben, sind diese Prozentzahlen kritisch zu betrachten, da davon auszugehen ist,

dass viele der Patienten auch hinsichtlich der Größe in niedrigen Perzentilen liegen. Fuqua et al. berichten, dass das Wachstum von Kindern vor und nach Transplantation oft eingeschränkt ist. In herztransplantierten Kindern ist die Größe variabel und Minderwuchs ist oft abhängig von der Immunsuppression mit Cyclosporin.<sup>65</sup> Ohne Größenangaben können somit keine verlässlichen Aussagen über den Allgemeinzustand der Kinder getroffen werden.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Korrelation des Gewichts mit dem Alter dar. Da ältere Kinder mehr Impfungen vor Transplantation und vor Studienbeginn aufweisen als jüngere und das Gewicht mit dem Alter korreliert, könnte die Immunantwort bei höherem Gewicht ausgeprägter sein, da mehr Impfungen erfolgt sind und somit das immunologische Gedächtnis besser ausgeprägt ist. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation der Titeranstiege mit der Anzahl der Impfungen (siehe Kapitel 3.2.1.2.)

Die signifikant positive Korrelation der Titeranstiege in Differenzen gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid (siehe Abb. 25) zeigt, dass die Immunantwort auf Diphtherie- und Tetanustoxoid analog verläuft. Reagiert ein Patient auf Diphtherietoxoid mit einem schwachen Titeranstieg, dann reagiert er ebenso auf Tetanustoxoid schwach und umgekehrt. Diese Darstellung zeigt des Weiteren, dass das Kollektiv dieser Studie sehr inhomogen reagiert. Interessanterweise haben alle Patienten, die sowohl auf Tetanus- als auch auf Diphtherietoxoid maximal reagiert haben eine vollständige Grundimmunisierung vor Transplantation erhalten. Der positive Einfluss einer erfolgten Grundimmunisierung vor Transplantation auf den Impf Erfolg konnte sich in unserer Studie statistisch sonst nicht bestätigen und sollte in größeren Studien weitergehend untersucht werden. Bei der Betrachtung der Graphik zu den Titeranstiegen in Form der Differenzen ist zu beachten, dass die Darstellung durch die Sensitivitätsgrenzen des ELISA von 3,0 IU/ml für Diphtherie und von 10,0 IU/ml beeinflusst ist.

#### 4.2.1.3. Titeranstiege in Faktoren

In der Literatur findet sich insbesondere in Bezug auf virale Impfungen die Auswertung von Titeranstiegen über Faktoren.<sup>30,54,63</sup> In Bezug auf die Immunantwort auf Impfungen mit Diphtherie- und Tetanustoxoid ist Enke et al. die einzige Forschungsgruppe, die mit Faktoren arbeitet. Zum Vergleich zur Auswertung der Immunantwort in Differenzen wurde in dieser Arbeit auch die Auswertung über Faktoren vorgenommen. In der vorliegenden Literatur, vorwiegend über Impfungen mit inaktivierten Influenza- und Poliomyelitis-Viren wurde eine positive Impfantwort als ein mindestens 4-facher Anstieg definiert. Laut unserer Ergebnisse liegt ein Titeranstieg von  $\geq 4$ -fach für Antikörper gegen Diphtherietoxoid bei 39 % der Patienten und für Antikörper gegen Tetanustoxoid bei 75 % der Patienten vor. Enke et al. hat vor allem gegen Diphtherietoxoid eine stärkere humorale Antwort ermittelt. Der 4-fache Titeranstieg gegen Diphtherietoxoid wurde bei Enke von 84 % der Patienten erreicht, gegen Tetanustoxoid von 79 % der Patienten.

#### 4.2.1.4. Zusammenhänge der Titeranstiege und Titer vor und nach Impfung

In der Literatur finden sich Hinweise auf Zusammenhänge der Titer gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid vor Impfung zu denen nach Impfung. In der Studie von Trollfors wird berichtet, dass gesunde nicht transplantierte Patienten mit Titern  $<0,1$  IU/ml vor Impfung niedrigere Titer nach der Impfung hatten, als Patienten mit Titern  $\geq 0,1$  IU/ml.<sup>67</sup> Dies ließ sich in dieser Studie nicht bestätigen. Der Unterschied der Titer gegen Diphtherietoxoid nach Impfung zwischen den Gruppen  $<0,1$  IU/ml und  $\geq 0,1$  IU/ml war in dieser Arbeit nicht signifikant. Der Vergleich der Titer gegen Tetanustoxoid konnte in dieser Studie aufgrund zu geringer Patientenzahlen nicht durchgeführt werden.

Enke et al. berichteten, dass Patienten die einen weniger als 4-fachen Titeranstieg aufwiesen, signifikant höhere Diphtherie- bzw. Tetanustiter vor Auffrischimpfung hatten.<sup>54</sup> Dies ließ sich in unserer Studie nicht bestätigen. Die Gruppen mit unter vierfachem Titeranstieg unterschieden sich von den Gruppen mit über vierfachem Titeranstieg nicht hinsichtlich der Anzahl der Impfungen vor Auffrischimpfung.

Wir untersuchten auch den Zusammenhang der Titeranstiege mit der Anzahl der Vorimpfungen und der erfolgten Grundimmunisierung vor Transplantation. Da die Immunsuppression die Aktivierung der Lymphozyten herabsetzt, scheint es Sinn zu machen, dass Patienten mit erfolgter Grundimmunisierung vor Transplantation gegenüber Kindern ohne erfolgte Grundimmunisierung einen Vorteil hinsichtlich einer erfolgreichen Immunantwort haben. Auch könnte mit erhöhter Anzahl an Impfungen die Reaktion der Gedächtniszellen nach Auffrischimpfung erhöht sein. Dies ließ sich in unseren Ergebnissen jedoch nicht bestätigen.

#### 4.2.1.5. Unterschiede unserer Kohorte zu Kohorten anderer Studien

Weder in der Studie von Pedrazzi et al., von Huzly et al., von Ghio et al. noch bei Enke et al. wird so häufig Tacrolimus verwendet wie in unserer Kohorte. In der Studie von Enke et al. erhielten nur 3 von 42 Patienten Tacrolimus als Teil einer immunsuppressiven Therapie, jedoch alle Patienten Prednisolon. Bei Pedrazzi et al., Huzly et al. und Ghio et al. wurde Tacrolimus nicht verabreicht. In unserer Studie erhielten 23 Patienten Tacrolimus und nur 5 Patienten Steroide.

#### 4.2.1.6. Einfluss des Tacrolimus auf die humorale Immunantwort

In unserer Studie zeigte sich eine dosisabhängige Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort bezüglich der Behandlung mit Tacrolimus, vorwiegend für die humorale Antwort auf Tetanustoxoid und angedeutet auf Diphtherietoxoid.

Die signifikant negative Korrelation der FaktTit<sup>Tet</sup> und der DiffTit<sup>Tet</sup> mit der Tacrolimusedosis zeigt, dass die Dosis einen Einfluss auf die humorale Immunantwort auf Tetanustoxoid hat. Es zeigt sich somit das einheitliche Phänomen, dass die humorale Immunantwort auf Tetanustoxoid durch die Höhe

der Tacrolimusdosen vermindert wird. In der Korrelation der humoralen Immunantwort auf Diphtherietoxoid über Faktoren mit den Tacrolimusdosen zeigt sich lediglich eine Tendenz zur negativen Korrelation.

Bei Enke et al. zeigte sich kein Einfluss der immunsuppressiven Medikamente auf die humorale Immunantwort.

#### 4.2.1.7. Gründe für die Beeinflussung der humoralen Antwort durch Tacrolimus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Tacrolimus einen dosisabhängigen Einfluss auf die humorale Antwort hat. Je höher die Tacrolimusdosis, desto geringer fällt die humorale Immunantwort aus. Durch die Wirkweise von Tacrolimus ist diese Beobachtung erklärbar. Durch die Blockierung des Calcineurins wird die Synthese von zahlreichen Zytokinen und Zelloberflächenrezeptoren reduziert bzw. bleibt aus, die für die T-Zellproliferation und die Interaktion mit den B-Zellen essentiell sind, z.B. IL-2, IL-4, und CD40-Ligand.<sup>6,18</sup> Die Impfantigene Tetanus- und Diphtherietoxoid sind Peptide. Daher verläuft die Bildung von Antikörpern T-Zell-vermittelt.<sup>11</sup> Bei Reduktion der Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten ist somit nur eine eingeschränkte Antikörperbildung möglich.

#### 4.2.1.8. Impfversager

In unserer Studie zeigte sich das Auftreten von Impfversagern. Vier Patienten erreichten nach Impfung weder ausreichende Titer gegen Diphtherie- noch gegen Tetanustoxoid. Weitere vier Patienten erreichten keine ausreichenden Titer gegen Tetanustoxoid.

Auch in der Studie von Huzly et al. traten Impfversager hinsichtlich der Impfung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid auf, woraufhin sie nach Titerkontrolle eine zusätzliche Auffrischimpfung verabreichten.<sup>63</sup> Diese Praxis scheint erfolgreich, da nach der zweiten Auffrischimpfung Erfolgsraten von 100 % auftraten. Die Erfolgsrate wurde 4-6 Wochen nach Impfung ermittelt. Darüber, wie lange diese Titer nach Impfung anhalten, berichten Huzly et al. nicht.

In Impfungen gegen Hepatitis B ist das Auftreten von Impfversagern bekannt und tritt in gesunden Menschen in 5-10 % auf.<sup>68</sup> In Reaktion auf das Impfversagen werden zusätzliche Auffrischimpfungen nach Ausbleiben des Titeranstieges empfohlen. So empfiehlt das Centre for Disease Control and Prevention (CDC) die Titer nach Impfung 1-6 Monate nach dem Verabreichen der Grundimmunisierung zu untersuchen. Bei Ausbleiben einer Immunantwort, raten sie zu einer erneuten Impfung mit  $\geq 1$  Impfung.<sup>69</sup> Die Ständige Impfkommission empfiehlt bei Nichtansprechen eine sofortige Wiederimpfung mit Kontrolle der Titer. Sollte dies ein erneutes Nichtansprechen belegen, sollten die Wiederimpfungen mit in der Regel maximal 3 Dosen wiederholt werden.<sup>70</sup> Nach einer zusätzlichen Impfung gegen Hepatitis B ist ein Auftreten protektiver Titer in 15-20 % der Personen zu erwarten und nach 3 zusätzlichen Dosen protektive Titer in 30-50 %.<sup>71</sup> Ob auf diese Weise erreichte

Titer lange anhalten ist fraglich. Wurde ein protektiver Titer erreicht, ist jedoch auch nach Verschwinden der Antikörper mit einer Restimmunität zu rechnen. Dies wurde in Populationen mit hohem Hepatitis-B-Auftreten beobachtet.<sup>68</sup>

Dies sollte auch hinsichtlich Impfversager gegen Tetanus und Diphtherie beachtet werden und unterstreicht die Bedeutsamkeit einer initial erfolgreichen Impfung.

#### 4.2.1.9. Vorschläge zur Verbesserung der humoralen Immunantwort

Die humorale Immunantwort ist unseren Ergebnissen nach durch die Medikation mit Tacrolimus eingeschränkt. Daher ist es empfehlenswert, die Auffrischimpfungen erst dann zu verabreichen, wenn die Tacrolimusdosis in niedrigeren Dosen verabreicht wird. Dies ist analog zum Risiko der akuten Abstoßung ungefähr 6 Monate nach Transplantation der Fall. Dies entspricht auch der Empfehlung von Duchini et al. und Stark et al..<sup>8,33</sup> Zur Detektion von Impfversagern schließen wir uns der Vorgehensweise von Duchini et al. und Huzly et al. an, die vorschlagen regelmäßige Titerkontrollen impfpräventabler Erkrankungen durchzuführen, da ein Erreichen der protektiven Titer nach Impfung ausbleiben kann und ein Absinken der Titer nach Impfung wahrscheinlich ist.<sup>33,63</sup> Abhängig von diesen Ergebnissen sollten die Kinder zeitnah nachgeimpft werden. Eine vergleichbare Herangehensweise wie bei Hepatitis B in der Verabreichung von erneuten Impfungen erscheint sinnvoll und sollte im Zusammenhang mit Impfversagern in Kohorten immunsupprimierter Kinder untersucht werden.

#### 4.2.1.10. Ausblick

Außerhalb dieser Arbeit wurde die Kohorte weiter beobachtet und 1-Jahres-Werte nach Impfung erhoben. Dies dient der Beobachtung der Langzeit-Effektivität der Impfungen, was von großer Relevanz ist, da in der Literatur ein Abfallen der Titer innerhalb des ersten Jahres beschrieben wird.<sup>54,63</sup>

#### 4.2.2. *Zelluläre Immunantwort auf Impfung*

Die Auswertungen zeigen, dass T-Lymphozyten 28 Tage nach Impfung keine spezifische Aktivität gegen die Toxoide der Impfungen aufweisen. Vielmehr scheint das allgemeine Aktivitätsniveau der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bezüglich der HLA-DR-Expression nach gegenüber vor Impfung erhöht. Des Weiteren gibt es einen signifikanten Unterschied in der Auswertung bezüglich der Anzahl der HLA-DR exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor/nach Impfung nach unspezifischer Stimulation mit PHA. Nach der Impfung sind die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten also unspezifisch aktiver als vor der Impfung.

Die Auswertungen zur Differenz vor/nach Impfung und die Auswertung von Abhängigkeiten zu anderen Variablen wurde über die Auswertung der Intensität der Expression über alle Zellen ausgewertet.



Die Auswertung der Intensität der Expression über alle Zellen erfolgte über die Intensität der Fluoreszenz markierter Oberflächenantigene auf Lymphozyten.

In dieser Auswertung zeigen sich signifikante Unterschiede in nativen und unstimulierten, Diphtherie-, Tetanustoxoid und PHA-stimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten hinsichtlich der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität vor zu nach Impfung bezüglich der HLA-DR-Expression (siehe Abb. 34). Dies macht deutlich, dass es sich vielmehr um eine allgemein stärkere Aktivität nach Impfung handelt. Unterstützt wird diese Feststellung auch durch die Ergebnisse eines Lymphozytenproliferationsassays, der im Rahmen der Studie, jedoch nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte. Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtung der Expressionen von Oberflächen auf T-Lymphozyten dahingehend, dass die Grundaktivität der Zellen nach Impfung erhöht ist

Diese Annahme wird in Abbildung 36 veranschaulicht, in der sich zeigt, dass der Fluoreszenzanstieg in unstimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten meist ähnlich stark ansteigt, wie nach Stimulation mit Diphtherie- und Tetanustoxoid. Dies zeigt sich auch in einem Vergleich der Differenzen. Die Fluoreszenzdifferenzen nach Stimulation mit Diphtherie-, Tetanustoxoid oder PHA weisen keinen signifikanten Unterschied zur Fluoreszenzdifferenz ohne Stimulation auf. Das bedeutet, dass tatsächlich keine erhöhte HLA-DR-Expression nach Stimulation auftritt, sondern die erhöhte HLA-DR-Expression auch in den unstimulierten Lymphozyten nach Impfung vorliegt.

Aus der Auswertung ergeben sich folgende Fragen:

- 1.) Was ist der Hintergrund und worin besteht die Problematik bei der Untersuchung der Effekte von Auffrischimpfungen?
- 2.) Wie lassen sich unsere Ergebnisse der zellulären Immunantwort im Vergleich zu anderen Studien einordnen?
- 3.) Auf welche Art und Weise kann die zelluläre Immunantwort eingeschränkt sein?

#### 4.2.2.1. Hintergrund und Problematik der Untersuchung der Effekte von Auffrischimpfungen

Das Prinzip der Auffrischimpfung besteht in der erneuten Aktivierung ruhender Gedächtnis-Zellen und Selektion besonders spezifischer T-Lymphozyten. Dies führt zur Entwicklung hochaffiner und hochspezialisierter Gedächtnis-Zellen, die bei erneuter Aktivierung noch schneller und effektiver die Infektion bekämpfen können.<sup>11</sup>

Die Proliferation und Differenzierung der Gedächtnis-Zellen zu Effektorzellen beginnt ab dem 3. Tag nach Infektion, erreicht am 5./6. Tag den Höhepunkt und sinkt dann zum 10./11. Tag wieder ab.<sup>72,73</sup>

Mit unserer Methodik haben wir die mit Hilfe der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR die Aktivierung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten untersucht. Diese Aktivitätsmarker wurden verwendet, da sie sich in vorausgegangenen Studien bewährt hatten. Durch Verwendung von Negativkontrolle und Stimulation mit spezifischen Antigenen und dem Vergleich dieser konnten wir die spezifisch

reagierenden Zellen ermitteln. Da die Untersuchung an Tag 28 nach Impfung stattfand ist davon auszugehen, dass es sich bei den aktivierten Zellen um Gedächtniszellen handelt.

Eine Untersuchung der zellulären Antwort 4-10 Tage nach Impfung wäre ideal gewesen. Die Patienten unserer Kohorte wurden jedoch aus dem gesamten süddeutschen Raum rekrutiert und sind durch häufige Blutentnahmen belastet. Daher wurde die Blutentnahme nach Impfung im Rahmen der monatlichen Kontroll-Blutentnahme durchgeführt und zur gleichzeitigen Bestimmung der Antikörpertiter auf Tag 28 festgelegt, da dies einen guten Zeitpunkt für die Untersuchung der humoralen Immunantwort darstellt.

#### 4.2.2.2. Vergleich unserer Ergebnisse zur zellulären Immunantwort mit anderen Studien

Afzelius et al. veröffentlichten eine Studie zur Verbesserung der Lymphozytenproliferation in HIV-Patienten nach rekombinanter IL-2 Behandlung.<sup>74</sup> Sie verwendeten die FACS-Analyse um die CD25-Expression auf CD4 und CD8 vor und nach IL-2 Gabe zu vergleichen. Sie beobachteten Normalwerte der CD25-Expression von 6 % (3-9 %) auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und von 1 % (0-4 %) auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten. Dies ist vergleichbar zu Werten der CD25-Expressionen auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten ohne Stimulation, die Antas et al. ermittelten.<sup>75</sup> Während Afzelius et al. die Lymphozyten direkt ohne Kultivierung untersuchten, kultivierten Antas et al. die Zellen parallel zur Dauer der Mitogen- und Antigen-Stimulationen. Sie führten eine Studie zur T-Zell-Aktivierung als Antwort auf *Mycobacterium tuberculosis*-Antigene durch.<sup>75</sup> Sie zeigen, dass ohne Stimulation CD25 auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten häufiger exprimiert wird, als auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten. Dies bestätigt sich auch in unseren Ergebnissen. In unserer Studie zeigte sich, dass der Anteil CD25-exprimierender unstimulierter CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung bei medianen Werten von 7,4 % und nach Impfung von 7,7 % liegt. Der Anteil CD25-exprimierender unstimulierter CD8<sup>+</sup> Lymphozyten liegt vor Impfung bei medianen Werten von 1,8 % und nach Impfung von 2,0 % (siehe Tab. 18 und 20).

In der Studie von Habermehl et al. wurde die Immunantwort in gesunden Kindern im Alter von 15-26 Monaten auf Auffrischimpfungen mit Diphtherie- und Tetanustoxoid und Erstimpfungen mit Varizella-Zoster-Virus (VZV) untersucht. Habermehl et al. werten nur den Anteil der exprimierenden Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten aus. Vor Impfung liegt der prozentuale Anteil der CD25-exprimierenden Zellen nach VZV-Stimulation bei  $0,51 \pm 0,47$  %. Damit liegen die Werte der Grundexpressionen Habermehls bedeutend unter denen unserer Studie und der Studien von Afzelius et al. und Antas et al..

Piersma et al. ermittelten in ihrer Studie zu sensitiven Assay Kriterien zur Immunantwort auf Tetanus Toxoid in einem in vitro Modell des Schweins bedeutend höhere Anteile von CD25-Expressionen auf Lymphozyten in der FACS-Analyse. Nach Verabreichen zweier Tetanus-Impfungen in Schweinen, ermittelten Piersma et al. nach 6 tägiger Stimulation mit Tetanustoxoid bzw. Kultivierung in CD8<sup>+</sup> Lymphozyten Anteile von CD25 exprimierenden Zellen von 19 % in der Negativkontrolle. Von den

CD4<sup>+</sup> Lymphozyten exprimierten 19 % der Negativkontrolle CD25. Grund für erhöhte Anteile von CD25-Expressionen kann die längere Kultivierung von 6 Tagen sein, desweiteren können jedoch auch grundsätzlich unterschiedliche Werte in Schweinen im Vergleich zu Menschen vorliegen.

Ashwood et al. führten in ihrer Studie zu veränderten T-Zell Antwort in Kindern mit Autismus FACS-Analysen durch und werteten unter anderem die HLA-DR- und CD25-Expression CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten aus. Der Anteil der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten die CD25 exprimierten lag in gesunden Kindern zwischen 2 und 5 Jahren ohne Stimulation bei 9,3 % und mit Stimulation mit PHA von 68,4 %. Der Anteil der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten die CD25 exprimierten lag ohne Stimulation bei 6,6 % und nach PHA-Stimulation bei 58,1 %.

Hinsichtlich der HLA-DR-Expression auf Lymphozyten findet sich weniger Literatur, vor allem in Bezug auf Kinder.

Ashwood et al. ermittelten einen Anteil der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten die HLA-DR exprimierten ohne Stimulation von 3,7 % und mit Stimulation mit PHA von 15,5 %. Der Anteil der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten die HLA-DR exprimierten lag ohne Stimulation bei 12,6 % und nach PHA-Stimulation bei 25,5 %. Dies stellt einen großen Unterschied zu unseren Werten dar, die hinsichtlich CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ohne Stimulation bei 2,1 %/2,4 % (vor Impfung/nach Impfung) und nach PHA-Stimulation bei 6,1 %/8,1 % lagen. Der Anteil der HLA-DR-exprimierenden CD8<sup>+</sup> Lymphozyten betrug ohne Stimulation 3,9 %/4,6 % (vor Impfung/nach Impfung) und nach PHA-Stimulation 7,4 %/8,5 % (siehe Tab. 19 und 21). Wiederum höhere Werte für HLA-DR-Expressionen ermittelten Salgado et al. in ihrer Studie zum Einfluss von Interleukinen auf HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten.<sup>76</sup> Die verwendeten Lymphozyten wurden aus dem Blut gesunder Erwachsener isoliert. So stellten Salgado et al. fest, dass ohne Stimulation 11 % der CD3<sup>+</sup> Zellen HLA-DR exprimierten, nach PHA Stimulation war dies in 38 % der Fall und unter Einfluss von Interleukinen, z.B. IL-2, stieg die Expression bis auf 79 % an. Bei genauerer Untersuchung der T-Lymphozyten-Untergruppen machten sie zwei Subpopulationen aus, eine die gering und eine die stark antwortet. Die gering antwortende Gruppe hatte HLA-DR-Expression nach PHA-Stimulation von 56 % auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und von 52 % auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten. Die Gruppe mit starker Antwort zeigte HLA-DR-Expressionen nach PHA-Stimulation von 73 % auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und von 86 % auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten. Interessanterweise zeigte lediglich die Gruppe der schwachen Antwort der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten eine positive Beeinflussung durch Interleukine.

Im Vergleich zu diesen beiden Studien liegen die Anteile der T-Lymphozyten die HLA-DR exprimieren in unserer Studie deutlich niedriger. Diese Tatsache und Erklärungsmöglichkeiten diesbezüglich werden in Kapitel 4.2.2.3.2. diskutiert.

Habermehl et al. hingegen ermittelten geringere Werte in der HLA-DR-Expression. So lag die HLA-DR-Expression nach Stimulation mit VZV-Antigen vor Impfung bei 0,69 ± 0,8 % auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und bei 0,55 ± 0,52 % auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten. Die Expressionen in der Studie von

Habermehl et al. scheinen sowohl für CD25, als auch HLA-DR im Vergleich zu anderer Literatur sehr niedrig zu liegen.

Da die Anteile der Expressionen der Aktivationsmarker in den verschiedenen Studien sehr unterschiedlich sind und es keine offiziellen definierten Bereiche gibt, findet ein Vergleich der Ergebnisse anderer Studien mit denen unserer Studie anhand der Signifikanzen statt.

Es werden drei Studien zitiert, die die zelluläre Immunantwort mittels FACS-Analyse ausgewertet haben. Zwei dieser Studien beziehen sich auf gesunde Kinder (Habermehl et al.) bzw. Schweine (Piersma et al.) und eine Studie arbeitete mit Kindern nach Herztransplantation (Kimball et al.).

Habermehl et al. beobachteten einen signifikanten Anstieg der CD25 und HLA-DR-Expressionen auf Lymphozyten nach VZV-Antigen-Stimulation von 48h und zeigten, dass auch 6 Wochen nach Impfung signifikante Anstiege der Expression von CD25 und HLA-DR bei nicht immunsupprimierten Patienten möglich sind.<sup>77</sup>

Piersma et al. zeigten signifikante Anstiege von CD25 und HLA-DR auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nach 6-tägiger Stimulation mit Tetanustoxoid nach erfolgter Impfung mit Tetanustoxoid in Schweinen.

Mit unseren Ergebnissen vergleichbare Resultate ermittelten Kimball et al.. In ihrer Studie über Influenzaimpfungen bei herztransplantierten Kindern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der HLA-DR und der CD25-Expression im Vergleich vor Impfung zu nach Impfung. Die Patienten erhielten die Influenzaimpfung zum ersten Mal. Kimball et al. machten keine Aussagen zur Kontrollgruppe hinsichtlich der zellulären Antwort.<sup>31</sup>

Die meisten Studien zur zellulären Immunantwort auf Impfungen wurden jedoch mittels Lymphozytenproliferationsassays (siehe Kapitel 4.2.2.5.3.) unter Verwendung von [<sup>3</sup>H] Thymidin oder Evaluation der IFN- $\gamma$  Produktion durchgeführt.

Weinberg et al. führten eine Studie zur Sicherheit und Effektivität von Varizella-Zoster-Virus in leber- und darmtransplantierten Kindern durch. Sie ermittelten positive zelluläre Immunantworten in Form von IFN- $\gamma$  Exkretion von 86 % in den immunsupprimierten Patienten. Es wurde keine Kontrollgruppe in der Studie verwendet. Im Unterschied zu unserer Studie betrug die Stimulationszeit in Weinbergs Studie 6 Tage. Des Weiteren lagen die Zielspiegel für Tacrolimus mit 4,8  $\mu$ g/ml deutlich unter den Talspiegeln unserer Patienten.

Madan et al. untersuchten die zelluläre Immunantwort auf Influenzaimpfungen von lebertransplantierten Kindern und deren Geschwistern. Die transplantierten Kinder erhielten zu großen Teilen Tacrolimus als Immunsuppression. Die zelluläre Immunantwort wurde über einen Lymphozytenproliferationsassay in Form eines IFN-gamma Elispot untersucht und es zeigte sich bei den transplantierten Kindern eine verminderte zelluläre Immunantwort auf die erste Influenzaimpfung im Vergleich zu den gesunden Geschwistern.<sup>78</sup> 4 Wochen später erhielten alle transplantierten Kinder und ein Teil der gesunden Kinder eine zweite Impfung. Die zweite Impfung führte in beiden Gruppen zu einer ähnlichen Immunantwort wie nach der ersten Impfung, somit lagen die ELISPOT-Werte der

IFN- $\gamma$ -Exkretion der Lymphozyten transplantierten Kinder nach zweiter Impfung wiederum unter denen der gesunden Geschwister.

In ihrer Studie zur zellulären Immunantwort auf Influenza Impfung im Vergleich gesunder und stammzelltransplantierten Erwachsener stellten Avetisyan et al. fest, dass bei Auftreten einer signifikanten zellulären Reaktion der gesunden Erwachsenen auf Influenza-Impfung, die Zahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen der stammzelltransplantierten Patienten signifikant geringer war und kein signifikanter Unterschied von vor zu nach Impfung vorlag.<sup>79</sup>

Lindemann et al. führten eine Studie zur humoralen und zellulären Immunantwort auf Influenza Impfung bei nierentransplantierten Erwachsenen durch. Sie stellten fest, dass eine spezifische humorale und zelluläre Immunantwort auf Impfung nachzuweisen war, die Stärke der Antwort jedoch signifikant geringer war als die in gesunden Kontrollen.<sup>80</sup> Es ist möglich, dass die Patienten dieser Kohorte die Tacrolimus erhielten (22 von 67 Patienten) aufgrund ihres Alters und der Nierentransplantation verglichen zu unseren Patienten geringere Dosen erhielten.

Es finden sich einige Studien zur zellulären Immunantwort von gesunden Kindern auf Impfungen gegen Bordetella pertussis. Rieber et al. und Guiso et al. verglichen den Impferfolg von azellulärer und ganz-Zell Pertussis Impfung nach Boosterimpfung. Guiso et al. ermittelten, dass einen Monat nach Booster Impfung 2-jährige Kinder zellulär stark auf drei untersuchte Pertussis-Antigene reagierten. Die azelluläre Impfung zeigte dabei bessere Ergebnisse als die ganz-Zell Impfung. Rieber et al. untersuchten die zelluläre Immunantwort auf eine Boosterimpfung in 10-14 jährigen gesunden Jugendlichen. Nach Impfung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der zellulären Immunantwort auf vier untersuchte Pertussis Antigene. So lag eine spezifische zellulär vermittelte Immunität vor Impfung in 43-71 % abhängig von den Antigenen vor und erhöhte sich auf 71-91 % abhängig von den Antigenen nach Impfung.

Bei der Literaturrecherche und Analyse der Literatur zeigt sich zusammenfassend, dass es keine Studien zur zellulären Immunantwort auf Tetanus- und Diphtherietoxoid in pädiatrischen Patienten gibt und dass zur Evaluation der zellulären Immunantwort meist Lymphozytenproliferationsassays verwendet werden. Im Vergleich der Studien unabhängig von der Art der Auswertung zeigt sich, dass in gesunden Kindern eine zelluläre Antwort auf Impfung erfolgt, während in immunsupprimierten Kindern und Erwachsenen mit Ausnahme der Studie von Weinberg et al. ein Ausbleiben oder zumindest eine eingeschränkte zelluläre Immunantwort wie auch in unserer Studie beobachtet wurde. Interessanterweise wird im Vergleich zum Großteil der Literatur in unserer Studie eine geringere Expression von CD25 und insbesondere HLA-DR deutlich. Besonders die Aktivierungsmarker-Expression nach Stimulation mit PHA fällt in unserer Studie geringer aus.

#### 4.2.2.3. Einschränkung der zellulären Immunantwort und der Stimulation

Die zelluläre Immunantwort kann an mehreren Stellen zu verschiedenen Zeitpunkten eingeschränkt sein.

- 1) Einschränkung der Expression von CD25 und HLA-DR
- 2) Einschränkung der Stimulation mit Reagenzien bzw. Antigenen und Mitogenen (spezifisch: Tetanus- und Diphtherietoxoid und unspezifisch: PHA)
- 3) Einschränkung der Interaktion verschiedener Zellen, vor allem über die Inhibition von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und Verminderung der Exkretion von Chemokinen, wie IL-2

Dies soll im Folgenden in Bezug auf diese Arbeit diskutiert werden.

##### 4.2.2.3.1. Einschränkung der Expression von CD25 und der Stimulation mit PHA

Bei der Auffrischimpfung kommt es zu einer Aktivierung der Gedächtnis-Zellen. Nach Aktivierung schütten die T-Lymphozyten IL-2 aus. IL-2 induziert die CD25-Synthese und -Expression. Über die Interaktion des IL-2 mit dem IL-2-Rezeptor, dessen  $\alpha$ -Kette das CD25 darstellt, werden die T-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen angeregt. IL-2 hat einen Einfluss auf die CD25-Expression.<sup>76</sup> Tacrolimus vermindert die IL-2-Synthese, inhibiert die proliferative Antwort auf IL-2 und die Expression von CD25.<sup>39,58</sup> Mit Anstieg der Tacrolimusdosis sinken die IL-2 Exkretion und die Stimulierbarkeit der Lymphozyten und damit nimmt deren Proliferation ab.<sup>39</sup> Ryffel et al. veröffentlichten eine Studie zur CD25-Expression auf T-Lymphozyten des Menschen in Hinblick auf die Empfindlichkeit auf Immunsuppressiva. Sie verwendeten [<sup>3</sup>H]thymidine proliferation assays, FACS und Northern blot analysis. Die Ergebnisse zeigen, dass unter Immunsuppression mit Tacrolimus die CD25-Expression nach Stimulation mit unspezifischen Stimulanzen im Vergleich zu nicht supprimierten Kontrollen in Abhängigkeit des Stimulans stark verringert sein kann. Bei Ryffel et al. zeigte sich in der FACS-Analyse nach 3 Tagen Stimulation eine CD25-Expression auf Lymphozyten (nicht näher eingegrenzt) von ungefähr 32 % ohne Immunsuppressivum und von ungefähr 30 % unter Tacrolimuseinfluss. Die ungefähren Werte ergeben sich aus dem Ablesen der Werte aus Graphiken. Die CD25-Expression nach Stimulation mit Ionomycin und OKT3 fiel unter Tacrolimuseinfluss stark verringert aus. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die CD25-Expression unter Tacrolimuseinfluss von der Art des Stimulans abhängig ist. Ryffel et al. postulieren, dass die Synthese von CD25 abhängig vom Stimulans durch Immunsuppressiva unterdrückt wird. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass vielmehr die Aktivierung der Lymphozyten durch die verschiedenen Stimulanzen durch die Immunsuppressiva unterdrückt wird. Es ist weiterhin auch möglich, dass Tacrolimus einen Einfluss auf die spezifische Stimulation mit Tetanus- und Diphtherietoxoid hat, die Reaktion auf PHA als unspezifisches Stimulans jedoch nicht vergleichbar stark unterdrückt wird. Da PHA als Mitogen über die Mitogen-activated-protein Kinase

die T-Lymphozyten direkt aktiviert, hat eine Suppression der Lymphozyten durch Tacrolimus möglicherweise keinen Einfluss auf die Aktivierung der Lymphozyten durch PHA. Diese These wird stark unterstützt von der Studie von Batten et al.<sup>38</sup> Diese stellen in ihrer Studie zu T-Zell-Antwort auf Endothel-Zellen des Menschen und des Schweins unter Einfluss von Immunsuppressiva fest, dass in vitro die Zellantwort auf PHA resistent gegen Tacrolimus und Cyclosporin ist, die Immunantwort auf andere Stimulanzen jedoch durchaus unterdrückt sein kann. Während unter Tacrolimus- und Cyclosporin-Einfluss die Stimulation der Lymphozyten durch MHC-II-Moleküle unterdrückt wurde, fand dennoch eine starke Stimulation durch PHA statt.

Antas et al. evaluierten die T-Zell-Immunantwort auf das unspezifische Stimulans PHA und spezifische Stimulanzen in Form von *Mycobacterium tuberculosis* Antigenen über CD25-Expression auf CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten mittels FACS-Analyse.<sup>75</sup> Sie ermittelten Expressionskurven über einen Zeitverlauf von 0-96 Stunden. Vergleichbar mit unserer Studie sind die 48-Stunden-Werte. Für die unspezifische Stimulation mit PHA ermittelten sie Werte von ungefähr 34 % für CD4<sup>+</sup> Lymphozyten und 32 % für CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nach 48h Stimulation. Hinsichtlich spezifischer Antigene lag die CD25-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bei ungefähr 3,5-4 % nach 48h, die Negativ-Kontrolle lag nach 48h bei ungefähr 2,2 %. Für die CD8<sup>+</sup> Lymphozyten gab es keine graphische Darstellung, die prozentualen Anteile an CD25<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nach spezifischer Stimulation war nach 96h dem Anteil der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten jedoch sehr ähnlich. Die ungefähren Angaben resultieren aus dem Ablesen der Werte aus Graphiken. Da die Patienten dieser Studie nicht immunsupprimierende Medikamente verabreicht bekommen, können wir davon ausgehen, dass diese Werte die Immunantwort von Immungesunden wiedergeben. Leider fand die Untersuchung lediglich an 5 Patienten statt, was die Aussagekraft der Ergebnisse schmälert. Im Vergleich zu unserer Studie sind die Werte der CD25-Expression als Antwort auf die unspezifische Stimulation mit PHA nahezu identisch.

Caruso et al. hingegen beobachteten in ihrer Studie zur FACS-Analyse von Aktivierungsmarkern auf stimulierten T-Zellen gesunder Personen einen höheren Prozentsatz von CD25- und HLA-DR-Expressionen nach Stimulation. Caruso et al. evaluierten CD3<sup>+</sup> Zellen hinsichtlich CD25 und HLA-DR-Expression (auch CD69 und CD72), nach Stimulation mit PHA, Tetanustoxoid und zwei weiteren Antigenen über eine Zeitspanne von 192 Stunden. Sie beobachteten nach 48 Stunden PHA-Stimulation CD25-Expressionen von ungefähr 77 % der CD3<sup>+</sup> Zellen und HLA-DR-Expressionen von ungefähr 55 %. Nach Tetanustoxoid-Stimulation beobachteten sie CD25-Expressionen auf ungefähr 8 % der CD3<sup>+</sup> Zellen und HLA-DR-Expressionen auf ungefähr 7 % der CD3<sup>+</sup> Zellen.

In unseren Auswertungen zeigte sich, dass die CD25-Expression nach PHA-Stimulation auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten signifikant negativ mit der Tacrolimusdosis korrelierte. Desweiteren zeigte sich eine negative Korrelation der CD25-Expression nach PHA-Stimulation auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten mit den Tacrolimuszielspiegeln. Dies deutet darauf hin, dass die PHA-Stimulation in Form der CD25-Expression auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nicht komplett unbeeinflusst von Tacrolimus bleibt.

Betreffend der Expression von CD25 nach PHA-Stimulation lässt sich also festhalten, dass die Expression von CD25 nach PHA-Stimulation in unserer Studie von Tacrolimus beeinflusst wird. Ob die CD25-Expression oder die Stimulation durch PHA unterdrückt wird, lässt sich nicht endgültig klären.

#### 4.2.2.3.2. Einschränkung der Expression von HLA-DR

Im Vergleich zur Literatur zeigt sich, dass in unseren Patienten der Anteil der HLA-DR exprimierenden Lymphozyten deutlich geringer war. Mögliche Gründe für diese Beobachtung sollen im Folgenden diskutiert werden.

Salgado et al. zeigten einen starken Einfluss von Interleukinen auf die HLA-DR-Expression auf Lymphozyten. Da die Produktion von Interleukinen durch Tacrolimus herabgesetzt wird, muss ein Einfluss von Tacrolimus diskutiert werden.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben zum Einfluss von Tacrolimus auf die HLA-DR-Expression. In einer Studie zur Therapie von Psoriasis-Läsionen mit Tacrolimus und Evaluation der HLA-DR-Expression auf Hautzellen beobachteten Vissers et al. dass Tacrolimus signifikant die Expression von erkrankten Zellen vermindert.<sup>81</sup> De Cal et al. untersuchten die HLA-DR-Expression auf Monozyten bei Nierentransplantationspatienten. Sie stellten fest, dass der Anteil der HLA-DR-Expression kurz nach Transplantation sank, dann jedoch wieder anstieg und nach 30 Tagen mit der HLA-DR-Expression auf Monozyten gesunder Kontrollpersonen vergleichbar war. Tacrolimus und Mycophenolat hatten geringen Einfluss auf die Verminderung der HLA-DR-Expression als beispielsweise Cyclosporin A.<sup>82</sup> Es ist zu beachten, dass diese beiden Studien die HLA-DR-Expression auf Monozyten und Epithelzellen und nicht auf Lymphozyten betrachten.

Souquiere et al. untersuchten dynamische Interaktionen zwischen einer viralen Infektion und der T-Zell-Antwort während einer chronischen Infektion und nach Immunsuppression in Mandrill-Affen. Sie ermittelten, dass bei viraler Infektion mehr CD4<sup>+</sup> Lymphozyten HLA-DR exprimieren und dass Tacrolimus einen supprimierenden Einfluss auf die HLA-DR-Expression auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten hat. Da die Studie an Mandrill-Affen durchgeführt wurde, können die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen werden.

Hinsichtlich des Einflusses von Tacrolimus auf die zelluläre Immunantwort erhielten wir in der Auswertung folgende Ergebnisse: Es zeigte sich eine signifikant negative Korrelation der Differenz der Fluoreszenzintensität hinsichtlich HLA-DR auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nach Diphtherieimpfung. Dies deutet darauf hin, dass der Anstieg der Expression von HLA-DR auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten von der Dosis von Tacrolimus abhängig ist. Je höher die Tacrolimusdosis ist, desto geringer ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität hinsichtlich der HLA-DR-Expression auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten von vor zu nach Impfung. Des Weiteren zeigte sich eine signifikant negative Korrelation der Tacrolimusdosis mit der Differenz der Fluoreszenzintensität hinsichtlich der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach PHA Stimulation. Also auch die Differenz der zellulären Immunantwort nach PHA-Stimulation



von vor zu nach Impfung auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten war abhängig von der Tacrolimusdosis. Diese beiden Ergebnisse lassen vermuten, dass der Prozess der Aktivierung der Lymphozyten durch die Impfung und somit die Aktivierung der Lymphozyten zu Effektorzellen und das Formen neuer Gedächtniszellen abhängig von Tacrolimus ist.

In der Auswertung der Aktivierung der Lymphozyten hinsichtlich der HLA-DR-Expression fällt auf, dass insbesondere die Mitogen-Stimulierung nicht zu hohen Anteilen an HLA-DR-exprimierenden Lymphozyten führt.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass HLA-DR erst spät exprimiert wird. So berichten Cotner et al. und Holling et al. davon, dass die HLA-DR-Expression vorwiegend nach 3-5 Tagen auftritt, während die CD25-Expression nach 1-3 Tagen auftritt.<sup>15,83,84</sup> Damit besteht die Möglichkeit, dass wir in unseren Untersuchungen den HLA-DR-Anstieg aufgrund zu früher FACS-Analyse nicht detektieren konnten.

Weiterhin haben wir eine vergleichsweise geringe Menge an PHA verwendet. Während in unserer Studie die Konzentration von PHA assay-abhängig 1 µg/ml betrug, wurde in anderen Studien 10 µg/ml<sup>85</sup>, 5 µg/ml<sup>14,75,74</sup> und 4 µg/ml<sup>77</sup> verwendet. Salgado et al. verwendet 1 µg/ml, wie in unserer Studie, sie stimulierten jedoch über 5 Tage. Dies könnte eine weitere Erklärung für die geringere HLA-DR-Expression nach Stimulation mit PHA liefern.

#### 4.2.2.3.3. Unspezifische Erhöhung der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach Impfung

HLA-DR ist wie CD25 ein Antigen, was bei Aktivierung auf den T-Lymphozyten exprimiert wird. HLA-DR ist ein Vertreter der MHC-II-Moleküle. Die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten stehen mit MHC-II-Molekülen in Kontakt, um darauf präsentierte fremde Antigene zu erkennen. Neben den APC exprimieren weitere Zellen, wie auch aktivierte T-Lymphozyten MHC-II-Moleküle. Verschiedene Studien ermittelten, dass eine T-Zell-Interaktion (T-T-Kontakt) mit MHC-II-Molekülen möglich ist. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser T-T-Kontakt zu Anergie und Apoptose führt.<sup>83</sup> Denn neben dem ersten Signal, der Erkennung eines präsentierten Antigens auf einem MHC-Molekül ist das zweite Signal, eine Kostimulation, für die Aktivierung von naiven und Gedächtnis-Zellen unabdingbar. Bleibt das zweite Signal aus, was bei einem T-T-Kontakt der Fall ist, werden die T-Zellen anerg oder unterlaufen Apoptose. So hätte die MHC-II-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten mehr regulatorische Funktion. Dies könnte das generell erhöhte Aktivitätsniveau nach Impfung erklären.

In unserer Auswertung fanden wir eine signifikant positive Korrelation der Tacrolimusdosis mit der Differenz zwischen der HLA-DR-Expression nach PHA Stimulation und der unstimulierten Kontrolle auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung. Dies bedeutet, dass der Anstieg der HLA-DR-Expression, der vor Impfung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mehr erfolgt, wenn mit PHA stimuliert wird von der Tacrolimusdosis abhängt. Bei höherer Dosis von Tacrolimus wird mehr HLA-DR nach PHA-

Stimulation exprimiert. Dieses Ergebnis lässt sich in der Literatur nicht wiederfinden, es unterstützt jedoch die Hypothese, dass die MHC-II-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten regulatorische Funktion besitzen könnte.

Souquiere et al. evaluierten in Affen, dass bei viraler Infektion mit STLV-1 mehr CD4<sup>+</sup> Lymphozyten HLA-DR exprimieren.<sup>86</sup> Da die Studie an Affen durchgeführt wurde können die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Eine generelle erhöhte Anzahl an HLA-DR-exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach Infektion könnte jedoch die generell erhöhte Anzahl nach Impfung erklären.

#### 4.2.2.3.4. Einschränkung der Stimulation mit Antigenen und Mitogenen

In unserer Auswertung zeigte sich, dass wir keine signifikant erhöhte spezifische zelluläre Antwort in Form von Expressionen von Aktivitätsmarker auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten nach Impfung beobachten konnten.

Caruso et al. stellen fest, dass die Aktivität der CD3<sup>+</sup> Zellen nach Tetanustoxoid-Stimulation über Zeit immer mehr ansteigt. Nach 48h, dem Zeitpunkt an dem unsere Daten gewonnen wurden, beobachteten sie CD25-Expressionen auf ungefähr 8 % der CD3<sup>+</sup> Zellen und HLA-DR-Expressionen auf ungefähr 7 % der CD3<sup>+</sup> Zellen. Nach 192 Stunden exprimierten ungefähr 74 % der CD3<sup>+</sup> Zellen CD25 und ungefähr 71 % der CD3<sup>+</sup> Zellen exprimierten HLA-DR. Sie berichten von nahezu identischen Werten für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten.<sup>14</sup> Interessanterweise war die Reaktion auf PHA nach 48h schon sehr viel ausgeprägter, als die der spezifischen Stimulation. So stieg die CD25 und HLA-DR-Expression auf CD3<sup>+</sup> Lymphozyten nach PHA-Stimulation von 0 % nach 4 Stunden auf CD25-Expressionen von ungefähr 77 % der CD3<sup>+</sup> Zellen und HLA-DR-Expressionen von ungefähr 55 %. Die ungefähren Werte ergeben sich aus dem Ablesen der Werte aus Graphiken. Egea et al. stellten fest, dass die optimale Antwort auf Tetanustoxoid im Lymphozytenproliferationsassay bei 5 bis 7 Tagen liegt, während die größte Antwort auf PHA in den Tagen 3-5 auftrat.<sup>84</sup>

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine Aktivierung über Antigene längere Zeit in Anspruch nimmt, als die Aktivierung über Mitogene, wie PHA. Dies könnte für unsere Studie bedeuten, dass die Stimulationsdauer für die Antigenstimulation zu kurz war. Auch Antas et al. beobachteten einen weiteren Anstieg der Anzahl der aktivierten Zellen nach 48 Stunden Stimulation mit PPD und Ag85B, Antigenen des *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>75</sup>

Interessanterweise wurden in einigen Studien, die Lymphozytenproliferationsassays durchführten längere Stimulationszeiten verwendet. So stimulierten Guiso et al. 2.5 Tage mit PHA und 5.5 Tage mit Pertussis-Antigenen.<sup>87</sup> Rieber et al. stimulierten 2 Tage mit PHA und 6 Tage mit Pertussis-Antigenen<sup>88</sup> und Weinberg et al. stimulierten mit PHA und VZV-Antigene über 6 Tage.<sup>89</sup> Dies unterstützt die Vermutung, dass eine längere Stimulationsdauer mit Antigenen vorteilhaft sein könnte. Es ist jedoch zu beachten, dass es bei sich diesen Analysen um einen Nachweis von Produkten als Antwort auf eine

Stimulation handelt. Die Protein- und DNA-Synthese im Rahmen der Proliferation findet zeitlich später statt als die Expression von Aktivierungsmarkern.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass, wie in der Einleitung bereits erwähnt, Tacrolimus auch einen Einfluss auf die Antigenpräsentation auf B-Lymphozyten durch Blockierung des sIg hat.<sup>11</sup> Daher ist es vorstellbar, dass die Präsentation über die B-Lymphozyten stark herabgesetzt ist, was eine Reduktion der Aktivierung durch Antigene verursacht.

Da PHA als Mitogen, über die Mitogen-activated-protein Kinase die T-Lymphozyten direkt aktivieren sollte, ohne von anderen Zellen präsentiert zu werden, wäre die unspezifische Stimulation durch PHA durch die Beeinträchtigung der B-Lymphozyten somit nicht beeinflusst.

Auch könnte die zelluläre Immunantwort auf spezifische Stimulation durch Tacrolimus direkt unterdrückt werden. Tacrolimus beeinflusst die Funktionsweise der T-Lymphozyten. Durch die Blockierung des Calcineurins bleibt die Synthese von zahlreichen Zytokinen und Zelloberflächenrezeptoren aus, die für die T-Zellproliferation und die Interaktion mit den B-Zellen essentiell sind, z.B. IL-2, IL-4, und CD40-Ligand.<sup>6,18,38</sup> Somit wäre es nicht verwunderlich, wenn die Immunantwort direkt von Tacrolimus beeinflusst wird. In unserer Auswertung der zellulären Immunantwort hinsichtlich Abhängigkeit von Tacrolimusedosen zeigte sich eine signifikante Korrelation des Fluoreszenzintensitäts-Anstiegs hinsichtlich HLA-DR auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten (siehe Abb. 37), dies bestätigt diese Vermutung.

Auch die Tatsache, dass im Vergleich mit der Literatur bei gesunden Kindern Anstiege in der Aktivität der T-Lymphozyten nach spezifischer Stimulation nach Impfung beobachtet werden<sup>77</sup> untermauert die These, dass die Immunsuppression einen Einfluss hat. Lindemann et al. wiesen in ihrer Studie nach, dass immunsupprimierte Erwachsene nach Nierentransplantation mit einer geringeren zellulären Immunantwort auf Influenza reagieren als gesunde Erwachsene. Desweiteren stellten sie einen Einfluss der Immunsuppressiva, insbesondere des Tacrolimus fest.<sup>80</sup>

#### 4.2.2.4. Beeinflussende Faktoren der zellulären Immunantwort

##### 4.2.2.4.1. Korrelation der zellulären Immunantwort mit klinischen Parametern

Die zelluläre Immunantwort wurde in Form der Differenz der kompensierten Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten untersucht. In Abhängigkeit zu anderen Variablen zeigte sich eine positive Korrelation mit der humoralen Immunantwort in Form der Differenz der Titer vor/nach Impfung auf Diphtherietoxoid.

Diese Korrelation zeigt, dass Patienten mit niedriger humoraler Antwort auch gering zellulär reagieren. Dies macht Sinn, da aktivierte CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bei der Differenzierung von Antigen-stimulierten B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen benötigt werden.<sup>90</sup>

Madan et al. und Lindemann et al. ermittelten keine Korrelation zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort in Form von einer IFN- $\gamma$ -Produktion bei Influenzaimpfung in lebertransplantierten

Kindern<sup>78</sup> und in nierentransplantierten Erwachsenen.<sup>80</sup> Egea et al. zeigten hingegen in ihrer Studie zur zellulären Grundlage des Ausbleibens der humoralen Immunantwort auf Hepatitis B, eine Abhängigkeit der humoralen von der zellulären Antwort in immungesunden Kindern. Die T-Zell-Proliferation wurde wie bei Madan et al. und Lindemann mittels Lymphozytenproliferationsassay unter Verwendung von [<sup>3</sup>H]Thymidin (siehe Kapitel 4.2.2.5.3.) durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei Impfversager nach Impfung mit Hepatitis-B-s-Ag auch die Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten ausblieb.<sup>84</sup>

#### 4.2.2.4.2. Einfluss von Tacrolimus

Elementar zur Untersuchung dieses Einflussfaktors ist die Verwendung einer Kontrollgruppe. Da wir in unserer Studie ohne Kontrollgruppe gearbeitet haben, lässt sich der Einfluss von Tacrolimus nur durch Korrelationen der Tacrolimusdosen mit klinischen Werten und Ergebnissen untersuchen. Dies wurde durchgeführt und in den vorhergehenden Kapiteln diskutiert.

Um den exakten Einfluss von Tacrolimus auf die zelluläre Immunantwort in transplantierten Kindern genauer zu untersuchen, sollten weitere Studien mit Einsatz von Kontrollgruppen durchgeführt werden.

#### 4.2.2.4.3. Einfluss der Impfungen vor Transplantation auf die Immunantwort

Aufgrund der Vermutung, dass die Gedächtniszellbildung der T-Lymphozyten unter Immunsuppression geringer ausfällt,<sup>20</sup> wurde untersucht, ob die Immunantwort auf Impfung von der Anzahl der Impfungen vor Transplantation abhängig ist. Vor Transplantation war die Gedächtniszellbildung noch nicht eingeschränkt und daher könnte die Möglichkeit bestehen, dass das Immunsystem von Patienten mit vollständiger Impfprophylaxe vor Transplantation besser auf Auffrischimpfungen nach Transplantation reagiert. Diese Hypothese ließ sich nicht bestätigen.

Es ergaben sich keine signifikanten Abhängigkeiten. Die humorale und zelluläre Immunantwort auf die Auffrischimpfung ist weder von der Anzahl der Impfungen vor Transplantation noch von der Gesamtzahl von Impfungen abhängig.

Auch eine erfolgte vollständige Grundimmunisierung vor Transplantation hat in unserer Studie keinen Einfluss auf die zelluläre und humorale Immunantwort.

#### 4.2.2.5. Ausschluss von systematischen Fehlern und Methodenkritik

##### 4.2.2.5.1. Ausschluss von Fehlern im Versuchsaufbau

Es wurden Fehler in der Verarbeitung, Kultivierung, Stimulierung und Auswertung in Betracht gezogen. Die Patienten wurden nicht alle parallel, sondern über ein Jahr verteilt untersucht, sodass parallel zur Untersuchung von Proben vor Impfung auch Proben nach Impfung ausgewertet wurden. Das Vorliegen fehlerhafter Toxoide, Kulturmedien, Fluorochrome bezüglich der Untersuchung nach Impfung kann somit ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde die Messung am FACS standardisiert ausgewertet. Anhand der Negativkontrolle wurden die Lymphozyten-Gruppen durch ein Setzen von Grenzlinien unterschieden und die Einstellung wurde für die Auswertung der spezifischen Stimulationen beibehalten. Für die unspezifische Stimulation mussten aufgrund der starken Stimulation diese Einstellungen individuell angepasst werden. Dieses Vorgehen wurde für die Auswertung vor und nach Impfung angewendet, was unterschiedliche Herangehensweisen vor und nach Impfung ausschließt. Um einen Fehler in der Kultivierung auszuschließen, wurden in unseren Versuchsaufbau zwei Negativkontrollen angefertigt. Die erste Negativkontrolle ist nativ (keine Kultivierung, keine Stimulation), die zweite Negativkontrolle ist unstimuliert (keine Stimulation, aber Kultivierung). In dem Vergleich dieser beiden Negativkontrollen lässt sich eine Veränderung der Aktivität der T-Lymphozyten beurteilen. Bei einem stimulierenden Kulturmedium wäre eine höhere Aktivität der unstimulierten Negativkontrolle im Vergleich zur nativen Negativkontrolle zu erwarten. Wie aus den Boxplots in Abbildung 30 bis 33 ersichtlich, ist dies nicht der Fall. Daher ist nicht von einer fehlerhaften Kultivierung auszugehen. Die generelle Fähigkeit zur Proliferation wurde durch PHA stimulierte Positivkontrollen belegt.

Auch Inhomogenitäten der Gruppe wurden untersucht. Besonders 3 Aspekte wären mögliche Einflussgrößen:

- 1.) Durchführung von Impfungen und Blutentnahmen an unterschiedlichen Orten
- 2.) Der Abstand zwischen Blutentnahmen und FACS-Analyse
- 3.) Der Abstand zwischen Impfung und 2. Blutentnahme

Die Patienten unserer Kohorte wurden in unterschiedlichen medizinischen Einrichtungen behandelt. Die Impfungen fanden im Klinikum Großhadern, in Kinderarztpraxen und anderen Kliniken statt. Um einen Einfluss der verschiedenen medizinischen Einrichtungen auf die Antwort des Immunsystems auf Impfung ausschließen zu können, wurde untersucht, ob die Patienten unterschiedlicher Impforte einen signifikanten Unterschied in der humoralen Antwort auf Diphtherietoxoid und Tetanustoxoid aufweisen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, somit hatte der Ort der Impfung keinen Einfluss auf die humorale Immunantwort.

Aufgrund von Terminproblemen der Patienten war es nicht in allen Fällen möglich einen Abstand von 28 Tagen zwischen Impfung und 2. Blutentnahme (BE) einzuhalten. Daher ergibt sich eine Zeitspanne von 21-35 Tagen. Es erfolgten eine Einteilung der Patienten in 3 Gruppen und ein Vergleich dieser

hinsichtlich der Differenzen zur PHA-Stimulation vor Impfung (siehe Kapitel 3.2.4.3.) und der Differenz der HLA-DR-Expression auf unstimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen diesen Gruppen. Des Weiteren erfolgte eine Korrelation der Zeitabstände zwischen Impfung und zweiter Blutentnahme mit den jeweiligen Variablen. Auch diese Auswertung zeigte keine signifikanten Korrelationen. Somit hat in unserer Studie die Anzahl der Tage zwischen Impfung und 2. Blutentnahme keinen Einfluss auf die humorale und die zelluläre Immunantwort haben.

Die Patienten unserer Kohorte wurden aus ganz Süddeutschland rekrutiert, daher war es aufgrund der langen Anfahrtswege nicht möglich, alle Patienten im Klinikum Großhadern zu impfen und ihnen Blut abzunehmen. Aufgrund dessen erfolgten viele Blutentnahmen, vor allem die Blutentnahme nach Impfung, bei Hausärzten oder in anderen Krankenhäusern. Daher ergaben sich bei den verschiedenen Patienten Abstände zwischen Blutentnahme und FACS-, Kultivierungs- und Stimulierungsbeginn von 0-3 Tagen. Die 2. BE wurde meist in Hausarztpraxen durchgeführt, wodurch sich größere Abstände zwischen Blutentnahme und FACS-Analyse ergaben. Daher erfolgte eine Gruppeneinteilung nach Abstand der Tage zwischen 2. Blutentnahme und FACS-Analyse. Diese Gruppen wurden hinsichtlich der allgemeinen zellulären Immunantwort in Form der Fluoreszenz bezüglich der HLA-DR-Expression auf unstimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten als Differenz vor/nach Impfung und hinsichtlich der Differenz der Fluoreszenz bezüglich der HLA-DR-Expression auf PHA-stimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, die Stimulierbarkeit nach Impfung darstellend, ausgewertet (siehe Kapitel 3.2.4.2.). Die Ergebnisse zeigen, dass der Abstand der 2. BE zur FACS-Analyse keinen Einfluss auf die unspezifische Aktivierung und die Stimulierbarkeit der HLA-DR exprimierenden CD4<sup>+</sup> Lymphozyten hat.

#### 4.2.2.5.2. Problematik der FACS-Analyse als Methode zur Bestimmung der zellulären Immunantwort

Die FACS-Analyse ist ein sinnvolles Verfahren zur Untersuchung von aktivierten T-Lymphozyten hinsichtlich CD25 und HLA-DR.<sup>14</sup> Sie wird jedoch zur Untersuchung der zellulären Immunantwort im Zusammenhang mit Impfungen selten verwendet. Daher gibt es wenig Literatur und keine gängigen Grenzwerte zur zellulären Immunantwort. Für die Untersuchung der Immunantwort hat die FACS-Analyse den Vorteil, dass sie die Zellen direkt betrachtet und deren Aktivität direkt über die Oberflächenantigene bestimmen kann. Über Vergleiche vor Impfung zu nach Impfung lässt sich eine Veränderung der Anzahl von aktivierten Zellen evaluieren. Der Nachteil besteht darin, dass die Expression der Aktivitätsmarker kein Nachweis dafür ist, dass die Zellen tatsächlich proliferieren. Dies könnte jedoch in einer zweiten FACS-Analyse über die Zunahme aktiver Zellen oder über die Verwendung des Fluoreszenzmarkers CFSE, der proliferierende Zellen anfärbt untersucht werden. Die FACS-Analyse ist eine teure Untersuchung durch die aufwändige Synthese der verwendeten Antikörper.

#### 4.2.2.5.3. Alternativen zur FACS-Analyse

Eine Frage dieser Arbeit hinsichtlich der zellulären Antwort betrifft das Vorhandensein aktiver Zellen, bzw. die Proliferation der Zellen. Neben der FACS-Analyse gibt es Methoden, die eine Aussage über die Proliferation der Lymphozyten erlauben. Diese Untersuchungen können mit Untersuchungsmethoden zur Lymphozytenproliferation (Lymphozytenproliferationsassay) überschrieben werden. Bei dem Lymphozytenproliferationsassay wird dabei das Ausmaß der Proliferation der Lymphozyten über die Messung des Zellstoffwechsels oder der Zytokinproduktion bestimmt. Es gibt verschiedene Arten der Lymphozytenproliferationsassay. Eine Art des Proliferationsnachweises erfolgt über die Gabe von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin in die Lymphozytenkultur,<sup>14</sup> diese Methode wurde im Rahmen der Studie durchgeführt, ist aber nicht Teil dieser Doktorarbeit. Bei Proliferation der Zellen besteht eine hohe Protein- und DNA-Synthese. Statt des normalen Thymidin wird bei der DNA-Synthese von der Zelle das radioaktiv markierte Thymidin verwendet. Die Menge des aufgenommenen Tritiums und damit der radioaktive Zerfall korreliert somit mit der DNA-Produktion und daher mit der Zellproliferation. Die Menge des aufgenommenen Tritiums wird über die Messung der Radioaktivität bestimmt.<sup>91</sup>

Eine weitere Art des Proliferationsnachweises erfolgt über den Nachweis Zytokin-produzierender Zellen.<sup>77,78</sup> Dieses Verfahren, auch ELISPOT genannt, ermöglicht es, die Menge der Zellen die Zytokine produzieren kann in einem Kulturmedium mittels enzymatischer Farbreaktion über die Anzahl der Spots bestimmt werden. Die verschiedenen Untersuchungsmethoden zur Lymphozytenproliferation haben den Nachteil gegenüber der FACS-Analyse, dass nicht bestimmte Lymphozytensubpopulationen speziell betrachtet werden können, sondern immer die Gesamtheit der Lymphozyten beobachtet werden muss. Desweiteren werden die Zellen nicht direkt gemessen und hinsichtlich einer Eigenschaft untersucht, sondern über ein Produkt der Zellen wird auf die Zellen rückgeschlossen, was fehleranfällig ist. Bei dem Proliferationsnachweis mittels [ $^3\text{H}$ ]Thymidin gibt es interindividuell stark unterschiedliche Grundaktivitäten, daher muss mit Stimulationsindizes (Bewertung der ermittelten Werte in Abhängigkeit der Negativkontrollen) gearbeitet werden. Das ELISPOT-Verfahren hat wie die FACS-Analyse den Nachteil, dass aufgrund seltener Verwendung wenige Studien veröffentlicht sind und keine festgelegten Grenzwerte existieren.

#### 4.2.2.5.4. Methodenkritik

Durch die Festlegung der Blutentnahme auf 28 Tage nach Impfung wurde die Aktivierung der nach Immunreaktion auf Impfung entstandenen Gedächtniszellen untersucht.

Somit war es nicht möglich die Reaktivierung der vor Impfung vorhandenen Gedächtniszellen und speziell die Proliferation zu Effektorzellen und deren Replikation zu untersuchen.

Die Untersuchung der Effektorzellen kurz nach Impfung könnte sehr aufschlussreich sein, da dieser Vorgang die eigentliche Reaktion auf die Sekundärinfektion darstellt und zu der Immunantwort führt,

die Infektionen abwehrt. Nach unseren Ergebnissen zum Einfluss von Tacrolimus auf die zelluläre und humorale Immunantwort zu urteilen, scheint es lohnenswert diesen Teil der Immunantwort zu untersuchen, um zu evaluieren wie stark die Bildung von Effektorzellen durch Tacrolimus unterdrückt wird und ob die Patienten unter Immunsuppression zellulär adäquat auf eine Infektion reagieren.

Um bei einer Untersuchung 28 Tage nach Impfung immunspezifischere Aussagen zur Bildung und Aktivierung von Gedächtniszellen zu treffen, könnte man diese gezielt durch Oberflächenantigene detektieren. Als spezifische Oberflächenantigene würden sich unter anderem CD44 oder CD45RO eignen.

Man könnte die Lymphozyten des Weiteren hinsichtlich der Proliferation, als Konsequenz einer Aktivierung, untersuchen. Eine behinderte Zellproliferation bedeutet nicht gleich einen Defekt in der Expression von Antigenen, T-Zell-Aktivierung und Zell-Kommunikation.<sup>14</sup> Caruso et al. berichten, dass nach kurzer Stimulation eine Antigenexpression stattfindet, jedoch keine Proliferation initiiert wird. Um die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu überprüfen, sollte eine zweite, spätere FACS-Analyse oder zusätzlich ein Lymphozytenproliferationsassay angefertigt werden. Der Lymphozytenproliferationsassay wurde im Rahmen unserer Studie, jedoch nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt.

Um weiterhin definitive Aussage zum Einfluss von Tacrolimus zu machen, ist eine Kontrollgruppe notwendig. Dies ist ein limitierender Faktor in unserer Studie. Im Fall immunsupprimierter Kinder nach Herztransplantation gilt es zu beachten, dass transplantierte Kinder sich von gesunden Kindern nicht nur hinsichtlich einer Immunsuppression unterscheiden, sondern auch hinsichtlich häufigerer Krankenhausaufenthalte, schwerer Erkrankungen und Infektion, Behandlungen mit vielfältigen Medikamenten und deren Nebenwirkungen und letztendlich einer schwerwiegenden Operation mit Transplantation. Dies macht es schwierig eine adäquate Kontrollgruppe zu bilden. Desweiteren ist es ethisch nicht unbedenklich eine zusätzliche Blutentnahme bei gesunden Kindern durchzuführen.

Eine weitere Limitation unserer Studie stellt die geringe Patientenzahl dar. Wie bereits in Kap. 4.1.1. erläutert, ist aufgrund der geringen Anzahl von Patienten die Rekrutierung einer großen Studiengruppe nicht möglich. In der statistischen Auswertung führt dies zu mehreren Effekten. Zum Ersten ist es schwieriger einen Unterschied zwischen zwei Eigenschaften zu detektieren und zum Zweiten fallen Ausreißer stärker ins Gewicht als in größeren Studiengruppen. Dadurch erscheinen in unserer Studie viele der durchgeführten Korrelationen aufgrund von Ausreißern stärker signifikant als sie wirklich sind. Dies wird in der Größe der Korrelationskoeffizienten deutlich.

Mit unserem Versuchsaufbau zur zellulären Immunantwort untersuchen wir eine Immunreaktion *in vitro*, die mit der *in vivo*-Situation nicht gleichgesetzt werden kann. Bei der Stimulation isolierter Lymphozyten aus Vollblut fehlt ein Teil der antigenpräsentierenden Zellen und die T-Lymphozyten umgibt ein anderes Milieu. Des Weiteren hält sich der Großteil der Gedächtniszellen in sekundären Lymphorganen auf. So sind die zu untersuchenden Zellen nur ein Ausschnitt aus der Gesamtheit der



zellulären Immunabwehr. Untersuchungen von Lymphknoten- oder Milzgewebe wären eine gute Alternative, da die enthaltenen Zellen die natürliche Umgebung bei der Immunreaktion eher imitieren können als isolierte Blutlymphozyten und sich dort ein großer Anteil der Gedächtniszellen aufhält. Jedoch sind derartige Untersuchungen sehr invasiv und würden die chronisch kranken Patienten zusätzlich belasten.

Des Weiteren haben wir mittels der Analyse der Antikörper-Titern des peripheren Blutes auch eine Untersuchung des *in vivo* Zustandes der Immunantwort im Rahmen unserer Studie durchgeführt.

#### 4.2.3. *Einflüsse der Impfung auf die Abstoßung der transplantierten Organe*

In unserer Studie zeigt sich, dass die immunsuppressive Wirkung von Tacrolimus einen Einfluss auf die Aktivierung der T-Lymphozyten hat. Die Aktivierung der T-Lymphozyten ist eingeschränkt und es gibt Hinweise auf ein Überwiegen einer Selbstregulation und Selbsthemmung der T-Lymphozyten durch Tacrolimus. Durch die Impfung ließ sich lediglich ein unspezifischer Anstieg der HLA-DR-Expression auf CD4<sup>+</sup> Lymphozyten beobachten. Ein erhöhtes Risiko für eine Transplantatabstoßung nach Impfung ist in unserer Studie somit nicht auszuschließen, im Rahmen unserer Studie ist jedoch kein Symptom einer Abstoßung aufgetreten. Ob Impfungen Transplantatabstoßungen triggern können ist umstritten. Stark et al. bemerken, dass Impfungen Transplantatabstoßung triggern könnten.<sup>8</sup> Verma et al. schreiben, dass kein definitiver kausaler Zusammenhang zwischen Impfung und Abstoßung etabliert wurde.<sup>20</sup> Enke et al. und Ghio et al. beobachteten wie wir, dass keine Abstoßungsepisoden nach Impfung auftraten.<sup>53,54</sup> Kimball et al. postulierten, dass aufgrund fehlender zellulärer Aktivierung keine erhöhte Gefahr für Abstoßungsreaktionen vorliege. Ein Voranschreiten von Abstoßungsreaktionen wurde nicht beobachtet.<sup>31</sup> Auch nach Impfung mit attenuierten Lebendimpfstoffen, beispielsweise gegen Influenza, wurde keine Abstoßung beobachtet.<sup>77</sup> Mit zunehmender Anzahl der Studien auch hinsichtlich Lebendimpfstoffen, zeichnet sich mehr und mehr die Sicherheit der Impfung und ein Ausbleiben von Abstoßungsereignissen ab.<sup>32</sup> Da hingegen impfpräventable Erkrankungen nachweislich zu vermehrten Transplantatabstoßungen führen können,<sup>24,25</sup> scheint es sinnvoll diesen durch Impfungen vorzubeugen, da die Konsequenzen einer impfpräventablen Infektion bedrohlicher erscheinen, als die potentiellen Nebenwirkungen der Impfungen.<sup>25</sup>

Die Transplantatabstoßung ist dennoch ein Ereignis, das es auf jeden Fall zu vermeiden gilt, so schließen wir uns der Empfehlung an, dass Impfungen Patienten mit stabiler Organfunktion ohne Symptome einer Abstoßung vorbehalten sein sollten.<sup>8</sup>

#### 4.2.4. *Nebenwirkungen der Impfungen*

Die Impfung gegen Tetanus und Diphtherie wurde von den Patienten unserer Studie gut vertragen. Es traten selten subjektiv als schwer eingestufte Nebenwirkungen auf, vielmehr waren 92 % der Beschwerden leichter und mittlerer Art. Es traten sehr häufig lokale Nebenwirkungen in Form von Schmerz an der Impfstelle in 75 %, Schmerz im betreffenden Muskel in 38 % eine Schwellung in 8 % und eine Rötung mit >5mm Durchmesser bei 4 % der Fälle auf. Diese Nebenwirkungen wurden in ähnlicher Häufigkeit auch in der Literatur beschrieben.<sup>9,54,55,63</sup> Ghio et al. beobachteten keine lokalen Nebenwirkungen.<sup>53</sup> Sie ermittelten diese Daten mittels Nachfragen und Nachuntersuchen der Infektionsstelle bei nieren- und lebertransplantierten Kindern nach Impfung gegen Tetanus- und Diphtherietoxoid. Dieses Ergebnis muss jedoch in Frage gestellt werden, wenn man bedenkt, dass alle anderen Veröffentlichungen Nebenwirkungen und miteinander vergleichbare Nebenwirkungsraten beobachteten und selbst von den Impfstoff produzierenden Pharmakonzernen lokale Nebenwirkungsraten von >10 % beschrieben werden.<sup>92</sup>

In gesunden 6-jährigen Kindern beobachtete Diez-Domingo et al. lediglich 50,4-59,4 % lokale Nebenwirkungen.<sup>93</sup> Auch Dagan et al. berichteten von geringeren lokalen Impfnebenwirkungen in 4 bis 7-Jährigen gesunden Kindern nach Auffrischimpfung mit Infanrix. Sie berichteten von einem Auftreten von lokalen Nebenwirkungen, bei 54 % der Kinder in Form von Schmerz an der Injektionsstelle, bei 32 % Rötung und bei 31 % Schwellung.<sup>94</sup> Verglichen mit unserer Studie traten insgesamt weniger lokale Nebenwirkungen auf, interessanterweise wurde in unserer Studie weniger Rötungen, dafür aber vermehrt Schmerz an der Injektionsstelle beobachtet. Die chronische Erkrankung und der gesteigerte Leidensdrucks der Patienten könnte die erhöhte Schmerzempfindlichkeit erklären. Das geringere Auftreten von Rötungen könnte durch eine geringere lokale Immunreaktion durch Immunsuppression bedingt sein.<sup>63</sup>

An systemischen Nebenwirkungen traten in unserer Kohorte in 33 % Unwohlsein, in 29 % eine Einschränkung der Belastbarkeit, in 21 % Kopfschmerzen, in 13 % Fieber, in 4 % ein Erythem und in 4 % unruhiger Schlaf auf. Sehr ähnliche Nebenwirkungshäufigkeiten wurde in der Studie von Scheifele et al. beobachtet, in der die Nebenwirkungen im Rahmen einer Grundimmunisierung mittels 5-fach-Impfung von gesunden Säuglingen beobachtet wurden.<sup>55</sup>

Diez-Domingo et al., führten Auffrischimpfungen mit 5-fach-Impfungen und 3-fach Kombinationen (gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis) an 6-jährigen Kinder durch. Sie beschrieben in 39,2 % (5-fach Impfstoff) 38,5 % (3-fach Impfstoff) der Kinder systemische Nebenwirkungen.<sup>93</sup> Das Nebenwirkungsspektrum veränderte sich je nach Alter. Fieber beispielsweise trat sehr häufig im Kleinkindalter bis 10 Jahre auf, weniger häufig im Alter über 10 Jahren. Kopfschmerzen hingegen traten sehr häufig im Alter von über 10 Jahren und weniger in jüngerem Alter auf.<sup>93</sup>

So verhielt es sich auch in unserer Studie. Von den 5 Patienten mit Kopfschmerzen waren 4 Patienten über 10 Jahre alt. Von den 3 Patienten mit Fieber waren 2 Patienten unter 10 Jahre alt. Dagan et al. berichteten von Auftreten von Fieber in ihrer Kohorte. Der Anteil der Kinder mit dieser systemischen

Nebenwirkung liegt mit 13 % exakt im selben Bereich wie in unserer Studie. Im Gegensatz zu unserer Studie traten bei Ghio et al. und Dengler et al. keine systemischen Nebenwirkungen auf.<sup>9,53</sup> Ghio et al. untersuchten die Nebenwirkungen anhand von Nachfragen und Nachuntersuchen der Injektionsstelle und Dengler et al. anhand eines Patiententagebuchs. Diese Beobachtung ist jedoch schwer nachzuvollziehen, da andere Forschungsgruppen mit unserer Studie vergleichbare Nebenwirkungsraten beobachteten und selbst von den Impfstoff produzierenden Pharmakonzernen systemische Nebenwirkungsraten von >10 % beschrieben werden.<sup>92</sup>

Die kardialen Symptome, die in unserer Kohorte auftraten wurden aufgrund der kurzen Dauer des Auftretens (1-3 Tage) nicht als Symptome einer Abstoßungsreaktion gewertet.

## 5. Zusammenfassung

Impfungen stellen bei herztransplantierten Kindern eine große Herausforderung dar. Aufgrund der immunsuppressiven Therapie ist das Risiko der Kinder an Infektionen zu erkranken stark erhöht. Zudem verlaufen die Infektionen schwerer und können zu akuten Abstoßungsreaktionen führen. Auch die Impferfolge fallen bei transplantierten Kindern oft geringer aus, als bei gesunden Kindern. Während es Studien zu humoraler und zellulärer Immunantwort auf Varizella-Zoster-Virus und Influenza-Antigene gibt, beschränken sich die Studien zu Diphtherie- und Tetanustoxoid auf wenige Veröffentlichungen zur humoralen Antwort.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass herz- und herzlungentransplantierte Kinder unter immunsuppressiver Medikation zum großen Teil humoral ausreichend auf Impfungen mit Diphtherie- und Tetanustoxoid reagieren. Im Gegensatz zu fast vollständigem Impferfolg bei gesunden Kindern gibt es in dieser Studie Impfversager auf die Impfung. Die Patienten, die nur schwach reagieren, reagieren sowohl auf Diphtherie-, als auch auf Tetanustoxoid nur mit geringem Titeranstieg. Dies lässt sich mit einer Einschränkung der humoralen Antwort durch die Immunsuppression, insbesondere korrelierend mit Tacrolimus, erklären. Je höher die verabreichten Tacrolimusdosen, desto geringer ist die humorale Antwort, sowohl auf Diphtherie-, als auch auf Tetanustoxoid.

Die Auswertung der zellulären Immunantwort zeigt das Ausbleiben einer signifikanten spezifischen zellulären Immunantwort auf Impfung. Hinsichtlich der Aktivierungsmarker zeigen sich Unterschiede. Während die unspezifische Stimulation mit Phytohämagglutinin im Vergleich zur Literatur hinsichtlich CD25-Expression sowohl auf CD4<sup>+</sup> als auch auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten erfolgreich war, zeigt sich keine ausreichende HLA-DR-Expression auf T-Lymphozyten.

Eine spezifische Immunantwort gegen Tetanus- und Diphtherietoxoid nach Impfung erfolgt weder in Form von vermehrter CD25- noch HLA-DR-Expression auf T-Lymphozyten. Hinsichtlich der HLA-DR-Expression sowohl auf CD4<sup>+</sup>, als auch auf CD8<sup>+</sup> Lymphozyten zeigt sich ein dosisabhängiger negativer Einfluss des Tacrolimus.

Eine erhöhte Gefahr der Transplantatabstoßung kann nicht ausgeschlossen werden, in der vorliegenden Arbeit wurden jedoch klinisch keine Hinweise auf eine Abstoßung gefunden. Auftretende Nebenwirkungen waren überwiegend leicht und in der Häufigkeit des Auftretens vergleichbar mit gesunden Patientenkollektiven.

Diese Studie zeigt, dass die Kontrolle von Talspiegeln die immunsuppressive Wirkung von Tacrolimus nicht ausreichend widerspiegelt und die Medikation mit Tacrolimus bei gleichen Talspiegeln einen dosisabhängigen Einfluss auf die humorale und zelluläre Immunantwort hat.

Daher sollten Impfungen erst nach Absenken der Tacrolimusdosis, das heißt mindestens 6 Monate nach Transplantation erfolgen. Weiterhin sollte, aufgrund des möglichen Impfversagens, eine

---

regelmäßige Kontrolle der Antikörpertiter für die impfpräventablen Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten erfolgen.

Es sind weitere Studien mit größeren Patientenzahlen und Kontrollgruppen notwendig, um den genauen Effekt der Immunsuppression bezüglich der zellulären Immunantwort zu untersuchen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Morales DLS, Dreyer WJ, Denfield SW, Heinle JS, McKenzie ED, Graves DE, Price JF, Towbin JA, Frazier OH, Cooley DA, Fraser CD Jr.** Over two decades of pediatric heart transplantation: How has survival changed? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. Mar 2007; 133 (3): 632-639.
2. **Schowengerdt KO.** Advances in pediatric heart transplantation. *Current opinion in pediatrics*. Oct 2006; 18 (5): 512-517.
3. **Milanesi O, Cerutti A, Biffanti R, Salcadori S, Gambino A, Stellin G.** Heart transplantation in pediatric age. *Journal of cardiovascular medicine*. Jan 2007; 8 (1): 67-71.
4. **Bauer J, Thul J, Krämer U, Hagel KJ, Akintürk H, Valeske K, Schindler E, Bohle RM, Schranz D.** Heart transplantation in children and infants: Short-term outcome and long-term follow-up. *Pediatric Transplantation*. Dec 2001; 5 (6): 457-462.
5. **Boucek MM, Aurora P, Edwards LB, Taylor DO, Trulock EP, Christie J, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI.** Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Tenth Official Pediatric Heart Transplantation Report--2007. *The journal of heart and lung transplantation*. Aug 2007; 26 (8): 796-807.
6. **Berg A.** Pediatric heart transplantation: a clinical overview. *Critical care nursing quarterly*. Nov 2002; 25 (3): 79-87.
7. **Poston RS, Griffith BP.** Heart transplantation. *Journal of intensive care medicine*. Jan-Feb 2004; 19 (1): 3-12.
8. **Stark K, Günther M, Schönfeld C, Bienzle U, Tullius SG.** Immunisations in solid organ transplant recipients. *Lancet*. Mar 2002; 359 (9310): 957-65.
9. **Dengler TJ, Strnad N, Bühring I, Zimmermann R, Girgsdies O, Kubler WE, Zielen S.** Differential Immune Response to Influenza and Pneumococcal Vaccination in Immunosuppressed Patients after Heart Transplantation. *Transplantation*. Nov 1998; 66 (10): 1340-1347.
10. **Campbell AL, Herold BC.** Immunization of pediatric solid-organ transplantation candidates: Immunizations in transplant candidates. *Pediatric Transplantation*. Oct 2005; 9 (5): 652-661.
11. **Murphy K, Travers P, Walport M.** *Janeway's Immunobiology*. New York, Abingdon : Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008.
12. **Hand TW, Kaech SM.** Intrinsic and extrinsic control of effector T cell survival and memory T cell development. *Immunologic research*. 2009; 45 (1): 46-61.
13. **Ingulli E.** Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatric nephrology*. Jan 2010; 25 (1): 61-74.
14. **Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A.** Flow Cytometric Analysis of Activation Markers on Stimulated T Cells and Their Correlation With Cell Proliferation. *Cytometry*. Jan 1997; 27 (1): 71-76.

15. **Cotner T, Williams JM, Christenson L, Shapiro HM, Strom TB, Strominger J.** Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. *The Journal of experimental medicine*. Feb 1983; 157 (2): 461-472.
16. **Tvede N, Heilmann C, Christensen LD.** Interleukin 2 receptor expression by human blood lymphocytes after vaccination with pneumococcal polysaccharides. *Clinical and experimental immunology*. Jun 1989; 76 (3): 404-411.
17. **Armitage RJ, Alderson MR.** B-cell stimulation. *Current Opinion in Immunology*. Apr 1995; 7 (2): 243-247.
18. **Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR.** The Mechanism of Action of Cyclosporin A and FK506. *Clinical immunology and immunopathology*. Sep 1996; 80 (3 pt 2): 40-45.
19. **Fagarasan S, Honjo T.** T-Independent Immune Response: New Aspects of B Cell Biology. *Science*. Oct 2000; 290 (5489): 89-91.
20. **Verma A, Wade JJ.** Immunization issues before and after solid organ transplantation in children. *Pediatric Transplantation*. Aug 2006; 10 (5): 536-548.
21. **Sester M, Gärtner BC, Girndt M, Sester U.** Vaccination of the solid organ transplant recipient. *Transplantation Reviews (Orlando Fla.)*. Oct 2008; 22 (4): 274-284.
22. **Chow J, Golan Y.** Vaccination of solid-organ transplantation candidates. *Clinical infectious diseases*. Nov 2009; 49 (10): 1550-1556.
23. **Urschel S, Cremer S, Birnbaum J, Dallapozza R, Fuchs A, Jäger G, Schmitz C, Belohradsky BH, Netz H.** Lack of serologic immunity against vaccine-preventable diseases in children after thoracic transplantation. *Transplant International*. Jun 2010; 23 (6): 619-627.
24. **Stucchi RS, Boin IF, Angerami RN, Sinckoc V, Sa FC, Seva-Pereira T, Escanhoela CA.** Correlations between A/H1N1 influenza and acute cellular rejection in liver transplantation patients. *Transplantation proceedings*. Dec 2010; 42 (10): 4184-4186.
25. **Mauch TJ, Bratton S, Myers T, Krane E, Gentry SR, Kashtan CE.** Influenza B virus infection in pediatric solid organ transplant recipients. *Pediatrics*. Aug 1994; 94 (2): 225-229.
26. **Miura M, Katada Y, Ishihara J.** Time interval of measles vaccination in patients with Kawasaki disease treated with additional intravenous immune globulin. *European journal of pediatrics*. Jan 2004; 163 (1): 25-29.
27. **Kano H, Mizuta K, Sakakihara Y, Kato H, Miki Y, Shibuya N, Saito M, Narita M, Kawarasaki H, Igarashi T, Hashizume K, Iwata T.** Efficacy and Safety of Immunization for Pre- and Post-liver transplant Children. *Transplantation*. Aug 2002; 74 (4): 543-550.
28. **Burroughs M, Moscona A.** Immunization of Pediatric Solid Organ Transplant Candidates and Recipients. *Clinical Infectious Disease*. Jun 2000; 30 (6): 857-869.

29. **Pedrazzi C, Ghio L, Balloni A, Panuccio A, Foti M, Edefonti A, Assael BM.** Duration of immunity to diphtheria and tetanus in young kidney transplant patients. *Pediatric Transplantation*. 1999; 3 (2): 109-114.
30. **Duchini A, Hendry RM, Nyberg LM, Viernes ME, Pockros PJ.** Immune Response to Influenza Vaccine in Adult Liver Transplant Recipients. *Liver transplantation*. Apr 2001; 7 (4): 311-313.
31. **Kimball P, Verbeke S, Flattery M, Rhodes C, Tolman D.** Influenza vaccination does not promote cellular or humoral activation among heart transplant recipients. *Transplantation*. Jun 2000; 69 (11): 2449-2451.
32. **Avery RK, Michaels M.** Update on immunizations in solid organ transplant recipients: what clinicians need to know. *American journal of transplantation*. Jan 2008; 8 (1): 9-14.
33. **Duchini A, Goss JA, Karpen S, Pockros PJ.** Vaccinations for Adult Solid-Organ Transplant Recipients: Current Recommendations and Protocols. *Clinical microbiology reviews*. Jul 2003; 16 (3): 357-364.
34. **Kaczmarek I, Deutsch MA, Kauke T, Beiras-Fernandez A, Schmoeckel M, Vicol C, Sodian R, Reichart B, Spannagl M, Ueberfuhr P.** Donor-Specific HLA Alloantibodies: Long-Term Impact on Cardiac Allograft Vasculopathy and Mortality After Heart Transplantat. *Experimental and clinical transplantation*. Sep 2008; 6 (3): 229-235.
35. **Gabrys CA.** Pediatric cardiac transplants: a clinical update. *Journal of pediatric nursing*. Apr 2005; 20 (2): 139-143.
36. **Urschel S, Altamirano-Diaz LA, West LJ.** Immunosuppression armamentarium in 2010: mechanistic and clinical considerations. *Pediatric clinics of North America*. Apr 2010; 57 (2): 433-457.
37. **Kay JE, Benzie CR, Goodier MR, Wick CJ, Doe SEA.** Inhibition of T-lymphocyte activation by the immunosuppressive drug FK-506. *Immunology*. Aug 1989; 67 (4): 473-477.
38. **Batten P, McCormack AM, Page CS, Yacoub MH, Rose ML.** Human T cell responses to human and porcine endothelial cells are highly sensitive to cyclosporin A and FK506 in vitro. *Transplantation*. Nov 1999; 68 (10): 1552-1560.
39. **Ryffel B, Willcocks JL, Brooks N, Woerly G.** Interleukin-2 receptor (CD25) upregulation on human T-lymphocytes: sensitivity to immunosuppressants is defined by the mode of T-lymphocyte activation. *Immunopharmacology*. Sep 1995; 30 (3): 199-207.
40. **Kershner RP, Fitzsimmons WE.** Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation*. Oct 1996; 62 (7): 920-926.
41. **Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, Mullins R, Pirsch J, MacFarlane G, Scheller D, Ersfeld D, Frick M, Fitzsimmons WE, Virji M, Jain A, Brayman KL, Shaked A.** Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *Journal of clinical pharmacology*. May 2001; 41 (5): 542-551.



- 
42. **Anglicheau D, Legendre C, Beaune P, Thervet E.** Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics*. Jul 2007; 8 (7): 835-849.
43. **Allison AC, Eugui EM.** Mechanisms of Action of Mycophenolate Mofetil in Preventing Acute and Chronic Allograft Rejection. *Transplantation*. Oct 2005; 80 (2 Suppl): 181-190.
44. **Filler G, Bendrick-Peart J, Christians U.** Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and sirolimus in children. *Therapeutic drug monitoring*. Apr 2008; 30 (2): 138-142.
45. **Dipchand AI, Pietra B, McCrindle BW, Rosebrook-Bicknell HL, Boucek MM.** Mycophenolic Acid Levels in Pediatric Heart Transplant Recipients Receiving Mycophenolate Mofetil. *The Journal of heart and lung transplantation*. Oct 2001; 20 (10): 1035-1043.
46. **Macey MG.** *Flow cytometry: principles and applications*. Totowa, New Jersey : Humana Press, 2007.
47. **Becton Dickinson Benelux N.V.** BD Biosciences. [Online] 2011. <http://www.bdbiosciences.com>.
48. **Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, von Hippel A, Jaeger U, Johnsen D, Korte W, Menner K, Müller G, Müller JM, Niemann-Pilatus A, Remer T, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Ziegler A, Hebebrand J.** Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 2001; 149 (8): 807-818.
49. **Ständige Impfkommission (STIKO).** Impfeempfehlungen der Ständigen Impfkommission des Bundesgesundheitsamtes. *Bundesgesundheitsblatt*. 1984, 1988, 1990, 1990, 1991, S. 308-311, 411-415, 74-78, 516-520, 384-388.
50. **Ständige Impfkommission (STIKO).** Impfeempfehlungen der Ständigen Impfkommission. *Bundesgesundheitsblatt*. 1993, 1995, 1996, 1997, S. 85-91, 108-114, 32-41, 97-107.
51. **Ständige Impfkommission (STIKO).** Empfehlungen der Ständigen Impfkommission am Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin*. 1998, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, S. 101-114, 9-20, 246-260, 227-242, 246-260, 236-250, 257-272, 235-254, 267-286.
52. **Poethko-Müller C, Kuhnert R, Schlaud M.** Durchimpfung und Determinanten des Impfstatus in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. May-Jun 2007; 50 (5-6): 851-862.
53. **Ghio L, Pedrazzi C, Assael BM, Panuccio A, Foti M, Edefonti A.** Immunity to diphtheria and tetanus in a young population on a dialysis regimen or with a renal transplant. *The Journal of pediatrics*. Jun 1997; 130 (6): 987-989.
54. **Enke BU, Bökenkamp A, Offner G, Bartmann P, Brodehl J.** Response to diphtheria and tetanus booster vaccination in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation*. Jul 1997; 64 (2): 237-241.

55. **Scheifele DW, Halperin SA, Rubin E, Tapiero B, Guasparini R, Meekison W, Predy G, Mills E, Noriega F.** Safety and Immunogenicity of a Pentavalent Combination Vaccine (Diphtheria, Tetanus, Acellular Pertussis, Polio and Haemophilus Influenzae Type b Conjugate) when Administered as a Fourth Dose at 15 to 18 Months of Age. *Human Vaccines*. Sep-Oct 2005; 1 (5): 180-186.
56. **Shishido S, Asanuma H, Tajima E, Honda M, Nakai H.** Pharmacokinetics of tacrolimus in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation proceedings*. Feb-Mar 2001; 33 (1-2): 1066-1068.
57. **Kausman JY, Patel B, Marks SD.** Standard dosing of tacrolimus leads to overexposure in pediatric renal transplantation recipients. *Pediatric Transplantation*. May 2008; 12 (3): 329-335.
58. **Zhao W, Fakhoury M, Jacqz-Aigrain E.** Developmental pharmacogenetics of immunosuppressants in pediatric organ transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring*. Dec 2010; 32 (6): 688-699.
59. **Arns W, Cibrik DM, Walker RG, Mourad G, Budde K, Mueller EA, Vincenti F.** Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplant patients treated with mycophenolate mofetil: review of the literature. *Transplantation*. Oct 2006; 82 (8): 1004-1012.
60. **Diana A, Posfay-Barbe KM, Belli DC, Siegrist CA.** Vaccine-induced immunity in children after orthotopic liver transplantation: A 12-yr review of the Swiss national reference center. *Pediatric Transplantation*. Feb 2007; 11 (1): 31-37.
61. **Ständige Impfkommission (STIKO).** Impfquoten bei den Schuleingangsuntersuchungen in Deutschland 2007. *Epidemiologisches Bulletin*. Apr 2009; 16: 143-154.
62. **Wasson S, Zafar MN, Best J, Reddy HK.** Post-transplantation Lymphoproliferative Disorder in Heart and Kidney Transplant Patients: A Single-Center Experience. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. Mar 2006; 11 (1): 77-83.
63. **Huzly D, Neifer S, Reinke P, Schröder K, Schönfeld C, Hofmann T, Bienzle U.** Routine Immunizations in adult renal transplant recipients. *Transplantation*. Mar 1997; 63 (6): 839-845.
64. **Dogan Y, Erkan T, Yalvac S, Altay S, Cullu Cokugras F, Aydin A, Kutlu T.** Nutritional status of patients hospitalized in pediatric clinic. *The Turkish journal of gastroenterology*. Dec 2005; 16 (4): 212-216.
65. **Fuqua JS.** Growth after organ transplantation. *Seminars in Pediatric Surgery*. Aug 2006; 15 (3): 162-169.
66. **Chandra RK.** Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proceedings of the Nutrition Society*. Aug 1999; 58 (3): 681-683.
67. **Trollfors B, Knutsson N, Taranger J, Mark A, Bergfors E, Sundh V, Lagergard T.** Diphtheria, tetanus and pertussis antibodies in 10-year-old children before and after a booster dose of three toxoids: implications for the timing of a booster dose. *European journal of pediatrics*. Jan 2006; 165 (1): 14-18.

68. **Sjogren MH.** Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination. *The American Journal of Medicine*. Oct 2005; 118 (10 Supplement): 34-39.
69. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR. Recommendation and Reports*. Nov 1991; 40 (RR-13): 1-19.
70. **Ständige Impfkommision (STIKO).** Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert-Koch-Institut/ Stand: Juli 2010. *Epidemiologisches Bulletin*. Aug 2010; 30: 279-298.
71. **Hadler SC, Francis DP, Maynard JE, Thompson SE, Judson FN, Echenberg DF, Ostrow DG, O'Malley PM, Penley KA, Atman NL, Braff E, Shipman GF, Coleman PJ, Eric JM.** Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in homosexual men. *The New England journal of medicine*. Jul 1986; 315 (4): 209-214.
72. **Whitmire JK, Eam B, Whitton JL.** Tentative T Cells: Memory Cells Are Quick to Respond, but Slow to Divide. *PLOS pathogens*. Apr 2008; 4 (4): 1-11.
73. **MacLeod MKL, McKee A, Crawford F, White J, Kappler J, Marrack P.** CD4 memory T cells divide poorly in response to antigen because of their cytokine profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sep 2008; 105 (38): 14521-14526.
74. **Afzelius P, Nielsen SD, Nielsen JO, Hansen JES.** Improvement of Lymphocyte Proliferation in Human Immunodeficiency Virus Infection after Recombinant Interleukin-2 Treatment. *Scandinavian journal of infectious diseases*. Oct 1999; 31 (5): 437-442.
75. **Antas PR, Oliveira EB, Milagres AS, Franken KC, Ottenhoff TH, Klatser P, Sarno EN, Sampaio EP.** Kinetics of T Cell-activation Molecules in Response to Mycobacterium tuberculosis Antigens. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Dec 2002; 97 (8): 1097-1099.
76. **Salgado FJ, Lojo J, Fernandez-Alonso CM, Vinuela JE, Cordero OJ, Nogueira M.** Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunology and Cell Biology*. Apr 2002; 80 (2): 138-147.
77. **Habermehl P, Lignitz A, Knuf M, Schmitt HJ, Slaoui M, Zepp F.** Cellular immune response of a varicella vaccine following simultaneous DTaP and VZV vaccination. *Vaccine*. Feb 1999; 17 (7-8): 669-674.
78. **Madan RP, Tan M, Fernandez-Sesma A, Moran TM, Emre S, Campbell A, Herold BC.** A Prospective, Comparative Study of the Immune Response to inactivated Influenza Vaccine in Pediatric Liver Transplant Recipients and Their Healthy Siblings. *Clinical Infectious Disease*. Mar 2008; 56 (5): 712-718.
79. **Avetisyan G, Ragnavölgyi E, Toth GT, Hassan M, Ljungman P.** Cell-mediated immune responses to influenza vaccination in healthy volunteers and allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*. Sep 2005; 36 (5): 411-415.

- 
80. **Lindemann M, Witzke O, Lütkes P, Fiedler M, Kreuzfelder E, Philipp T, Roggendorf M, Grosse-Wilde H.** ELISpot assay as a sensitive tool to detect cellular immunity following influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Clinical Immunology*. Sep 2006; 120 (3): 342-348.
81. **Vissers WH, van Vlijmen I, van Erp PE, de Jong EM, van de Kerkhof PC.** Topical treatment of mild to moderate plaque psoriasis with 0.3 % tacrolimus gel and 0.5 % tacrolimus cream: the effect on SUM score, epidermal proliferation, keratinization, T-cell subsets and HLA-DR expression. *British Journal of Dermatology*. Apr 2008; 158 (4): 705-712.
82. **de Cal M, Silva S, Cruz D, Basso F, Corradi V, Lentini P, Nalesso F, Dissegna D, Goepel V, Chiaramonte S, Ronco C.** Oxidative stress and 'monocyte reprogramming' after kidney transplant: a longitudinal study. *Blood Purification*. 2008; 26 (1): 105-110.
83. **Holling TM, Schooten E, van den Elsen PJ.** Function and Regulation of MHC Class II Molecules in T-Lymphocytes: Of Mice and Men. *Human immunology*. Apr 2004; 65 (4): 282-290.
84. **Egea E, Iglesias A, Salazar M, Morimoto C, Kruskall MS, Awdeh Z, Schlossman SF, Alper CA, Yunis EJ.** The Cellular Basis for Lack of Antibody Response to Hepatitis B Vaccine In Humans. *The Journal of experimental medicine*. Mar 1991; 173 (3): 531-538.
85. **Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IS, Van de Water J.** Altered T cell responses in children with autism. *Brain, Behaviour, and Immunity*. Jul 2011; 25 (5): 840-849.
86. **Souquiere S, Mouinga-Ondeme A, Makuwa M, Hermine O, Kazanji M.** Dynamic Interaction between STLTV-1 Proviral Load and T-Cell Response during Chronic Infection and after Immunosuppression in Non-Human Primates. *PLoS ONE*. Jun 2009; 4 (6): 1-11.
87. **Guiso N, Njamkepo E, Vie le Sage F, Zepp F, Meyer CU, Abitbol V, Clyti N, Chevallier S.** Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine*. Feb 2007; 25 (8): 1390-1397.
88. **Rieber N, Graf A, Belohradsky BH, Hartl D, Urschel S, Riffelmann M, Wirsing von König CH, Liese J.** Differences of humoral and cellular immune response to an acellular pertussis booster in adolescents with a whole cell or acellular primary vaccination. *Vaccine*. Dec 2008; 26 (52): 6929-6935.
89. **Weinberg A, Horslen SP, Kaufman SS, Jesser R, DeVoll-Zabrocki A, Fleckten BL, Kochanowicz S, Seipel KR, Levin MJ.** Safety and Immunogenicity of Varicella-Zoster Virus Vaccine in Pediatric Liver and Intestine Transplant Recipients. *American journal of transplantation*. Mar 2006; 6 (3): 565-568.
90. **Piersma SJ, Leenaars MP, Guzylack-Piriou L, Summerfield A, Hendriksen CFM, McCullough KC.** An in vitro immune response model to determine tetanus toxoid antigen (vaccine) specific immunogenicity: Selection of sensitive assay criteria. *Vaccine*. Apr 2006; 24 (16): 3076-3083.

- 
91. **Jacobs R.** Lymphocyte Functions. [Buchverf.] Uwe Tewes (Editor) Manfred Schedlowski (Editor). *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary introduction*. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999, S. 160-162.
92. **GlaxoSmithKline.** *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Infanrix Hexa*. Aulendorf : BPI Service GmbH, 2003. S. 1-4.
93. **Diez-Domingo J, Delgado JD, Ballester A, Baldó JM, Planelles MV, Garcés M, Graullera M, Ubeda MI, Sánchez F, Sánchez MM, Azor E, Cabrera A, López F, Alvarez M, San-Martín M, González A, Boisnard F, Thomas S.** Immunogenicity and Reactogenicity of a Combined Adsorbed Tetanus Toxoid, Low Dose Diphtheria Toxoid, Five Component Acellular Pertussis and Inactivated Polio Vaccine in Six-Year-Old Children. *The Pediatric infectious disease journal*. Mar 2005; 24 (3): 219-224.
94. **Dagan R, Igbaria K, Piglansky L, Van Brusteghem F, Melot V, Kaufhold A.** Reactogenicity and immunogenicity of reduced antigen content diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines as a booster in 4-7-year-old children primed with diphtheria-tetanus-whole cell pertussis vaccine before 2 years of age. *Vaccine*. Jan 1999; 17 (20-21): 2620-2627.

## 7. Tabellenverzeichnis

– Tabelle 1: Eigenschaften der Patienten .....	11
– Tabelle 2: Daten zum Protokollplan.....	13
– Tabelle 3: Tabelle mit Auflistung der verabreichten Impfstoffe, mit deren immunogenen Inhaltstoffen.....	15
– Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Fluorochrome und deren Eigenschaften .....	23
– Tabelle 5: Transplantationsbedürftig Herz-und Lungenerkrankungen .....	30
– Tabelle 6: Begleiterkrankungen .....	32
– Tabelle 7: Immunsuppressive Medikation der Patienten .....	33
– Tabelle 8: Angaben zu den verabreichten immunsupprimierenden Medikamenten .....	33
– Tabelle 9: Steroideinnahme in Abhängigkeit der Art der Transplantation .....	37
– Tabelle 10: Verordnungen von Medikamenten zusätzlich zur Immunsuppression .....	38
– Tabelle 11: Darstellung der Anzahl der Tetanusimpfungen der Patienten bei Transplantation	40
– Tabelle 12: Vergleich der Patienten mit vollständiger Grundimmunisierung vor Transplantation und ohne hinsichtlich des Alters bei Transplantation .....	41
– Tabelle 13: Darstellung der Anzahl der Tetanusimpfungen der Patienten bei Studieneinschluss .....	41
– Tabelle 14: Vergleich des ausreichenden Impfschutzes gegen Diphtherie- bzw. Tetanustoxoid bei 28 Patienten vor und nach Impfung.....	44
– Tabelle 15: Vergleich des ausreichenden kombinierten Impfschutzes gegen Diphtherietoxoid und Tetanustoxoid bei 28 Patienten vor Impfung und nach Impfung.....	45
– Tabelle 16: Vergleich der Gruppen der FaktTit <sup>Tet</sup> hinsichtlich der Höhe der Tacrolimusdosen .....	52
– Tabelle 17: Immunantwort der Patienten auf die Auffrischimpfung mit Diphtherie-und Tetanustoxoid .....	54
– Tabelle 18: Anteil der CD25-exprimierenden CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie-und Tetanustoxoid.....	55
– Tabelle 19: Anteil der HLA-DR-exprimierenden CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie-und Tetanustoxoid.....	56
– Tabelle 20: Anteil der CD25-exprimierenden CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie-und Tetanustoxoid.....	57
– Tabelle 21: Anteil der HLA-DR-exprimierenden CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten, Vergleich vor und nach Impfung mit Diphtherie-und Tetanustoxoid.....	58
– Tabelle 22: Stärke der kompensierten Fluoreszenzintensität von HLA-DR-FITC auf CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten, Vergleich vor und nach Diphtherie-und Tetanusimpfung.....	60

---

– Tabelle 23: Impfnutzenwirkungen .....	66
-----------------------------------------	----

## 8. Abbildungsverzeichnis

– Abbildung 1: Zeitplan der Studie .....	12
– Abbildung 2: Impflokalisation in Abhängigkeit vom Alter der Patienten .....	14
– Abbildung 3: Schema zur Anlage der Rundbodenplatten zur Kultivierung .....	21
– Abbildung 4: FACS-Analyse in Form eines Dotplot .....	24
– Abbildung 5: Dotplot aus den gegateten Lymphozyten nach der Fluoreszenz der an Anti-CD8 und Anti-CD4 gebundenen Fluorochrome APC und PerCP .....	25
– Abbildung 6: Dotplot der Lymphozyten nach der Fluoreszenz der mit Anti-CD25 und Anti-CD4 verbundenen Fluorochrome PE und PerCP .....	26
– Abbildung 7: Dotplot der Lymphozyten nach der Fluoreszenz der mit Anti-CD25 und Anti-CD4 verbundenen Fluorochrome PE und PerCP .....	26
– Abbildung 8: Histogramm der als R2 gegateten CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in Abhängigkeit zu der Fluoreszenz des an Anti-CD25 gebundenen Fluorochrom PE.....	27
– Abbildung 9: Korrelation der Tacrolimusdosis mit dem Alter bei Studieneinschluss .....	34
– Abbildung 10: Korrelation der Zielspiegel mit der Dosis von Tacrolimus.....	35
– Abbildung 11: Korrelation der Tacrolimuszielspiegel mit der Zeit seit Transplantation .....	35
– Abbildung 12: Korrelation der Tacrolimusdosis mit dem Gewicht der Patienten .....	36
– Abbildung 13: Korrelation der MMF-Dosis mit dem Gewicht der Patienten.....	36
– Abbildung 14: Korrelation der Anzahl der Tetanusimpfungen vor Transplantation mit dem Alter bei Transplantation.....	40
– Abbildung 15: Anzahl der Tetanusimpfungen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses .....	42
– Abbildung 16: Tetanustiter im Vergleich vor Impfung und nach Impfung .....	43
– Abbildung 17: Diphtherietiter im Vergleich vor Impfung und nach Impfung.....	44
– Abbildung 18: Titer gegen Tetanustoxoid vor und nach Impfung in Abhängigkeit zu der immunsuppressiven Medikation.....	46
– Abbildung 19: Titer gegen Diphtherietoxoid vor und nach Impfung in Abhängigkeit zu der immunsuppressiven Medikation.....	46
– Abbildung 20: Titeranstiege gegen Diphtherietoxoid als Differenz vor/nach Impfung.....	47
– Abbildung 21: Titeranstiege gegen Tetanustoxoid als Differenz von vor zu nach Impfung ....	48
– Abbildung 22: Korrelation des Gewichtes der Patienten mit der DiffTit <sup>Tet</sup> .....	48
– Abbildung 23: Korrelation Tacrolimusdosis mit der DiffTit <sup>Tet</sup> .....	49
– Abbildung 24: Korrelation des Titeranstieges in Form der Differenz vor zu nach Impfung gegen Tetanustoxoid mit dem angestrebten Tacrolimuszielspiegel.....	49
– Abbildung 25: Korrelation der Titeranstiege gegen Diphtherie- und Tetanustoxoid in Form der Differenz vor zu nach Impfung .....	50



---

– Abbildung 26: Histogramm zu den Faktoren der Diphtherietiter vor zu nach Impfung .....	51
– Abbildung 27: Histogramm zu den Faktoren des Titeranstieges gegen Tetanustoxoid vor zu nach Impfung .....	52
– Abbildung 28: Korrelation der Tacrolimusdosen mit den FaktTit <sup>Tet</sup> .....	53
– Abbildung 29: Korrelation der humoralen Antwort gegen Diphtherie-und Tetanustoxoid in Form von Faktoren von vor zu nach Impfung .....	533
– Abbildung 30: Anteil der CD25-exprimierenden CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung .....	55
– Abbildung 31: Anteil der HLA-DR-exprimierenden CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung .....	56
– Abbildung 32: Anteil der CD25-exprimierenden CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung .....	57
– Abbildung 33: Anteil der HLA-DR-exprimierenden CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten an der Gesamtzahl der Lymphozyten vor und nach Impfung .....	58
– Abbildung 34: Boxplots zu den Medianen der kompensierten Fluoreszenzintensität der Zytochrom-Markierung der HLA-DR-Antigene auf CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten vor und nach Impfung .....	59
– Abbildung 35: Graphische Darstellung der Differenz der medianen Fluoreszenzintensität, betreffend die HLA-DR-Expression auf unstimulierten und spezifisch stimulierten CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten vor zu nach Impfung .....	61
– Abbildung 36: Korrelation der humoralen Immunantwort auf Diphtherietoxoid vor zu nach Impfung in Form von Differenzen mit der zellulären allgemeinen Immunantwort vor zu nach Impfung in Form von Differenzen .....	62
– Abbildung 37: Korrelation der zellulären Immunantwort auf Diphtherietoxoid hinsichtlich der HLA-DR-Expression auf CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten mit der Tacrolimusdosis .....	63
– Abbildung 38: Korrelation Fluoreszenzintensitätsanstiegs in Form von HLA-DR-Expression auf CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten nach PHA-Stimulation mit der Tacrolimusdosis .....	63
– Abbildung 39: Korrelation der Tacrolimusdosis mit Differenz der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der HLA-DR-Expression auf CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA abzüglich der Negativkontrolle. ....	65
– Abbildung 40: Korrelation der Tacrolimusdosis mit Differenz der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der CD25-Expression auf CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA abzüglich der Negativkontrolle. ....	65
– Abbildung 41: Korrelation der Tacrolimuszielspiegel mit Differenz der medianen kompensierten Fluoreszenzintensität der CD25-Expression auf CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten vor Impfung nach Stimulation mit PHA abzüglich der Negativkontrolle. ....	66

## **9. Lebenslauf**

In Bibliotheks-Version nicht vorhanden

In Bibliotheks-Version nicht vorhanden

## 10. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken,

bei meinen Eltern, die mich auf meinem Weg stetig unterstützen und mir das Medizinstudium ermöglicht haben; die mir als hervorragende Beispiele für die Vielfältigkeit des Arztberufes dienen und mir durch ihr großes Engagement und ihren Enthusiasmus im Umgang mit Patienten ein großes Vorbild sind.

bei meiner Großmutter, die mich in meinem Studium vielfältig unterstützt hat und mir immer zur Seite stand; die in vieler Hinsicht mein Ideal der Hausärztin verkörperte und deren Zielstrebigkeit, Hingabe und Liebe zur Medizin mir immer ein gutes Beispiel sein werden.

bei Herrn Prof. Belohradsky, für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und das wiederholte Erinnern an die wichtigen Dinge im Leben.

bei Herrn Dr. med. Simon Urschel, für seine lokale und transatlantische Betreuung.

bei dem Team des Infektionsimmunologischen Labors, insbesondere bei Frau Irmgard Eckerlein und Frau Mayumi Hofmann, die mich sehr herzlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

bei Herrn Michael Schmidt, für die unermüdliche und herausragende Beratung zur statistischen Auswertung.

bei Gernot Hennig und Dr. med. Julia Birnbaum.